

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
Ciências Veterinárias

# **Qualidade Microbiológica do Colostro De Explorações de Bovinos Leiteiros na Região de Entre Douro e Minho**

Manuel António Cerejeira Maia

Orientador:

Professor Doutor Filipe da Costa Siva

Co-Orientadores:

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Doutora Carla Isabel Silva Miranda



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2021

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
Ciências Veterinárias

# **Qualidade Microbiológica do Colostro De Explorações de Bovinos Leiteiros na Região de Entre Douro e Minho**

Manuel António Cerejeira Maia

Orientador:

Professor Doutor Filipe da Costa Siva

Co-Orientadores:

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Doutora Carla Isabel Silva Miranda



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2021

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das orientações do meu supervisor. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

## AGRADECIMENTOS

No decorrer de todo o trabalho realizado para este estudo e de todos os anos de aprendizagem para o mesmo, muitos foram aqueles que se cruzaram no meu caminho e não podia deixar de agradecer aos que, de uma forma mais especial, o tornaram melhor.

Primeiramente, aos meus pais, que sempre me incentivaram e deram a possibilidade de ingressar na universidade e, mais importante de tudo, me transmitiram a educação e os valores que levo para a vida. Especialmente a ti, mãe, que me “chateavas” todas as santas noites preocupada se tudo estava bem comigo, “chateamentos” esses que hoje deixam tanta saudade...

Aos meus avós, que, mesmo sem terem essa noção, são uma enorme fonte de inspiração e de exemplo... Quando tiver a vossa idade, só quero ter a vossa jovialidade e vontade de viver.

Ao meu irmão, pelo exemplo de mano mais velho que sempre foi e por todo o esforço que fez para me possibilitar a realização de todo o trabalho para esta dissertação. À Sandra, por ser a minha guia na universidade e aquele braço direito em Vila Real quando andava às cegas.

À Daniela, por toda a paciência, todo o amor e todo o companheirismo ao longo dos últimos anos... Grande parte do esforço e da vontade de levar isto para a frente deveu-se a ti!

Aos meus colegas de casa de Vila Real, J.P., Luís, Pimenta, Pedro e Tiago, foram aqueles que mais fizeram valer a pena cada segundo passado nessa cidade. Foram vocês que estiveram lá nos dias mais difíceis de estudo e de trabalho, mas também foram vocês que estiveram lá nos dias de maior diversão... E quando assim é, sabemos que temos ali amigos para a vida! À Garcia e à Daniela Correia que, mesmo não sendo da casa, era como se fossem e traziam sempre um ambiente ao grupo que o tornava único!

Ao meu orientador, o professor Filipe Silva, por toda a ajuda, paciência, chamadas, videochamadas, e-mails, mensagens e reuniões que permitiram elaborar o trabalho que aqui apresento.

À professora Patrícia Poeta pela disponibilidade e por todo o interesse demonstrado em me ajudar a levar este projeto avante. À professora Carla Miranda por toda a ajuda no laboratório, pelos esclarecimentos de dúvidas e por estar sempre disponível para fazer algo mais para o estudo.

À professora Isabel Pires por todo o apoio e disponibilidade na execução de parte fundamental deste trabalho.

Ao José Maria, à doutora Alba e à doutora Carolina Tejero por me terem dado a possibilidade de estagiar numa realidade da produção leiteira tão diferente da que estamos acostumados e por toda a aprendizagem relativa ao maneio, tratamento e diagnóstico de patologias em vitelos neonatos, assim como toda a ajuda prestada para colher dados e amostras para este trabalho.

À doutora Carolina Maia, ao doutor Bruno Carneiro e ao doutor Miguel Pimentel da Diessen, a equipa de veterinários que acompanhei em Évora, por toda a disponibilidade demonstrada em esclarecer as minhas dúvidas e por toda a partilha de conhecimentos, que foi sem dúvida uma mais-valia para a minha evolução profissional e pessoal.

Ao projeto “Avaliação comparativa da resistência antimicrobiana em biofilmes ambientais através da proteómica — em busca de biomarcadores teranósticos inovadores — CAREBIO2”, com referência NORTE-01-0145-FEDER-030101 e PTDC/SAU-INF/30101/2017, financiado pelo European Regional Development Fund (ERDF) através de Northern Regional Operational Program (NORTE 2020) e a Foundation for Science and Technology (FCT).

## RESUMO

A qualidade microbiológica do colostro é um fator muitas vezes descurado pelas explorações, principalmente em território nacional, no que diz respeito aos cuidados no maneo e saúde do vitelo. São muitos os investigadores que referem a qualidade microbiológica como um dos quatro principais fatores de sucesso (ou insucesso) na transferência de imunidade passiva ao vitelo, sendo os outros a qualidade imunológica do colostro (quantidade de imunoglobulinas), o tempo decorrido desde o parto até à administração do colostro e a quantidade do mesmo fornecida.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar todos os pontos referidos anteriormente em duas realidades diferentes: uma na Catalunha, Espanha, numa exploração leiteira de grandes dimensões, e outra em explorações de produção leiteira da região Entre Douro e Minho, Portugal, de dimensões pequenas a médias e mais heterogéneas, dando especial ênfase à qualidade microbiológica do colostro, através da contagem total de colónias e identificação de agentes patogénicos presentes no colostro das várias explorações.

No total, foram colhidas 78 amostras de colostro nos dois locais referidos: 41 amostras relativas a 51 animais na Catalunha, Espanha, e 37 amostras em Portugal relativas ao mesmo número de animais, na zona Entre Douro e Minho. De todos os animais associados aos colostros analisados foram recolhidos dados relativos ao período perinatal.

No ensaio realizado em Espanha não se observou qualquer amostra contaminada, enquanto em Portugal 16,2% das amostras apresentaram contagens totais de carga microbiana elevadas, verificando-se a presença de *Staphylococcus aureus* em 8,1% das amostras totais, *Escherichia coli* em 13,5% e *Enterococcus* spp. em 78,4%.

Este estudo contribuiu para realçar a importância de boas práticas higio-sanitárias aquando do maneo do colostro, assim como a possível transmissão de agentes patogénicos para o vitelo.

**Palavras-chave:** vitelo, colostro, contaminação, qualidade microbiológica

## ABSTRACT

The microbiological quality of colostrum is a factor that is often overlooked by farms, especially in Portugal, regarding care in the management and health of the calf. Several researchers refer microbiological quality as one of the four main factors of success (or failure) in transfer of passive immunity to the calf, while the others are the immunological quality of colostrum (quantity of immunoglobulins), the time elapsed from birth to administration of colostrum and the quantity of colostrum supplied.

The aim of this study was to evaluate all the points mentioned above in two different realities: one in Catalonia, Spain, in a large dairy farm, and another in a more heterogeneous small to medium sized dairy farms in the region of Entre Douro e Minho, Portugal, with special emphasis on the microbiological quality of colostrum, making the total plate count and identification of pathogens present in colostrum of the different farms.

In total, 78 colostrum samples were collected at the two regions mentioned: 41 samples from 51 animals in Catalonia, Spain, and 37 samples in Portugal from the same number of animals in the region of Entre Douro e Minho. Data relating to the perinatal period were collected from all animals associated to colostrum samples.

In the essay performed in Spain, no contaminated colostrum was observed, while in Portugal 16.2% of the samples had high total plate count, verifying the presence of *Staphylococcus aureus* in 8,1% of the total samples, *Escherichia coli* in 13.5% and *Enterococcus* spp. in 78.4%.

This study contributed to highlight the importance of good hygienic-sanitary practices when handling colostrum, as a possible route of transmission of pathogens to the calf.

**Key-words:** calf, colostrum, contamination, microbiological quality

Dissertação apresentada à Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias - Departamento de Ciências Veterinárias - da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**Durante a realização desta Dissertação foram realizados os seguintes trabalhos:**

Comunicação Oral intitulada “A influência da qualidade microbiológica do colostro na saúde e bem-estar de vitelos da região de Entre Douro e Minho”, por Manuel Maia, Carla Miranda, Gilberto Igrejas, Filipe Silva e Patrícia Poeta. Foi apresentada nas XXIII Jornadas Internacionais de Medicina Veterinária da Associação de Estudantes de Medicina Veterinária da UTAD, no dia 7 de março de 2021 (Anexo I).

Elaboração de um poster científico intitulado “Microbiological composition of colostrum consumed by Portuguese dairy calves”, por Manuel Maia, Carla Miranda, Gilberto Igrejas, Filipe Silva e Patrícia Poeta. Foi apresentado no “4th International Caparica Conference in Antibiotic Resistance 2021”, onde lhe foi atribuída uma Comunicação Oral no dia 15 de junho de 2021 (Anexo II).

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	XIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	XV
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO .....	XVI
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 COLOSTRO .....	2
<b>1.1.1 Propriedades Nutritivas .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Propriedades Imunológicas.....</b>	<b>3</b>
1.2 COLHEITA DE COLOSTRO.....	6
1.3 ARMAZENAMENTO DE COLOSTRO.....	7
<b>1.3.1 Temperatura Ambiente .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 Refrigeração .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.3 Congelação.....</b>	<b>8</b>
1.4 ADMINISTRAÇÃO DE COLOSTRO .....	8
<b>1.4.1 Quantidade .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2 Idade do recém-nascido.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.3 Método de Toma .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.4 Qualidade.....</b>	<b>11</b>
1.5 AGENTES PATOGÉNICOS DE COLOSTRO.....	13
1.6 PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COLOSTRO.....	14
<b>1.6.1 Colheita de Colostro .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6.2 Armazenamento de Colostro .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6.3 Temperatura Ambiental.....</b>	<b>15</b>

<b>1.6.4 Administração de Colostro</b> .....	15
<b>1.7 PLANO HIGIÉNICO E MEDIDAS PREVENTIVAS</b> .....	15
<b>1.7.1 Colheita de Colostro</b> .....	15
<b>1.7.2 Pasteurização</b> .....	16
<b>1.7.3 Armazenamento de Colostro</b> .....	17
<b>1.7.4 Administração de colostro</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>3.1 CARATERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES</b> .....	21
<b>3.1.1 Ensaio 1</b> .....	21
<b>3.1.2 Ensaio 2</b> .....	22
<b>3.2 RECOLHA DE DADOS</b> .....	24
<b>3.2.1 Ensaio 1</b> .....	24
<b>3.2.2 Ensaio 2</b> .....	24
<b>3.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE COLOSTRO</b> .....	25
<b>3.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE</b> .....	26
<b>3.4 ANÁLISE MICROBIANA</b> .....	27
<b>3.4.1 Meios de Cultura</b> .....	27
<b>3.5 INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	29
<b>3.5.1 Inoculação em PCA para Contagem Total da Carga Microbiana</b> .....	29
<b>3.5.2 Inoculação em Meios Seletivos</b> .....	31
<b>3.5.3 Identificação Bacteriana</b> .....	31
<b>3.4 ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS IDENTIFICADAS</b> .....	33
<b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
<b>4.1 ENSAIO 1</b> .....	34
<b>4.1.2 Dados Recolhidos em Laboratório</b> .....	37

4.2 ENSAIO 2.....	38
<b>4.2.1 Caraterização da Amostra</b> .....	38
<b>4.2.2 Dados Recolhidos em Laboratório</b> .....	45
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	57
<b>8. ANEXOS</b> .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

Figura 1 - Pasteurizador DairyTech .....	22
Figura 2 - Refrigeração do Colostro em Luvas de Inseminação no Frigorífico.....	22
Figura 3 - Aquecimento do Colostro em Banho-Maria.....	22
Figura 4 - Refratómetro Digital Utilizado no Estudo.....	25
Figura 5 - Tubos de Vácuo e Seringa Descartável Utilizados no Estudo .....	26
Figura 6 – Os Meios de Cultura Utilizados para a Análise Microbiana .....	28
Figura 7 - Quatro Diluições de PCA com Crescimento .....	29
Figura 8 - Inoculação da Amostra em Placa de Petri com Meio PCA .....	30
Figura 9 - Relação entre a Facilidade de Parto e o Sexo do Vitelo nas Explorações Portuguesas .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 10 - Relação entre a Quantidade de Colostro Administrada e a Exploração .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 11 - Relação entre o Sexo do Vitelo e a Quantidade de Colostro Administrada nas Explorações Portuguesas.....	42
Figura 12 - Relação entre a Qualidade Microbiológica do Colostro e o seu Método de Conservação nas Explorações Portuguesas.....	43
Figura 13 - Relação entre a Qualidade Imunológica do Colostro e o Sexo do Vitelo nas Explorações Portuguesas.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 14 - Relação entre a Qualidade Imunológica do Colostro e a Proteína Sérica do Vitelo nas Explorações Portuguesas .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 15 - Meios de Cultura com Crescimento Bacteriano compatível com <i>Enterococcus</i> spp. ....	47
Figura 16 - Meios de Cultura com Crescimento Bacteriano compatível com <i>E. coli</i> .....	47
Figura 17 – Provas complementares para confirmação de presença de <i>E. coli</i> .....	48
Figura 18 - Meio de MSA com crescimento compatível com <i>S. aureus</i> .....	48
Figura 19 - Relação entre a Contaminação Microbiológica do Colostro e a Proteína Sérica do Vitelo nas Explorações Portuguesas .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>

## TABELAS

Tabela 1 – Constituição do Colostro .....	5
Tabela 2 - Dados Recolhidos na Exploração Espanhola.....	35
Tabela 3 - Contagens Totais da Carga Microbiana da Exploração Espanhola .....	37
Tabela 4 - Dados Recolhidos nas Explorações Portuguesas .....	39
Tabela 5 - Dados relativos à Contaminação Microbiológica de Colostro das Explorações Portuguesas.....	46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion

*E. coli* – *Escherichia coli*

Esc – Kanamycin Aesculin Azide Agar

FTP – Falha de Transferência Passiva

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

MSA – Mannitol Salt Agar

MRSA – Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*

PCA – Plate Count Agar

PT – Proteínas Totais

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SB – Slanetz and Bartley Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

## **ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO**

Iniciei o meu estágio curricular na Granja San José, em Tamarite de Litera, Catalunha, Espanha. Aqui permaneci desde o dia 1 de outubro de 2019 até 31 de outubro de 2019, onde acompanhei a Dra. Alba Sala Dorca, médica veterinária responsável pela recria de toda a exploração.

Neste local executei parte do estudo demonstrado neste trabalho, sendo que as principais atividades realizadas estiveram relacionadas com a alimentação, tratamento e manejo dos vitelos desde o nascimento até ao desmame. A exploração apresenta um grande número de animais (cerca de 10.000), o que me permitiu ficar a conhecer uma nova realidade a nível de organização e gestão, quer animal, quer humana.

Posteriormente, a partir de 5 de janeiro de 2020 até 28 de fevereiro de 2020, acompanhei a Dra. Carolina Maia, o Dr. Bruno Carneiro e o Dr. Miguel Pimentel da equipa da Diessen – Serviços Veterinários, em Évora.

Neste estágio, o objetivo foi acompanhar o veterinário de campo no seu trabalho. Aqui as atividades incidiram maioritariamente no manejo, gestão e controlo reprodutivos das explorações leiteiras associadas à equipa de veterinários, assim como alguns serviços de clínica, tais como cirurgias de deslocamento de abomaso, resolução de partos distócicos e fetotomias.

Para além da componente de campo, ainda realizei a componente laboratorial, no Laboratório de Microbiologia Médica na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na qual acompanhei os trabalhos desenvolvidos no mesmo e analisei microbiologicamente as amostras recolhidas.

## 1. INTRODUÇÃO

Os vitelos saudáveis são a base de qualquer sistema de produção de bovinos de sucesso, quer em termos económicos, quer do ponto de vista do bem-estar animal. Para além de levar a um aumento das despesas veterinárias e da taxa de mortalidade, tem-se verificado que a ocorrência de doenças nos primeiros meses de vida de um vitelo reduz o ganho médio de peso diário e aumenta o risco de desenvolvimento de doenças mais tarde na sua vida (Gulliksen *et al.*, 2009).

O foco na prevenção de doenças e não em tratamentos curativos significa que é necessário um sistema de vigilância de saúde eficiente (de Kruif *et al.*, 2007) e para isso contribui a recolha e análise de dados específicos de cada exploração que podem levar à deteção precoce de doenças e, portanto, a um controlo mais económico das mesmas (Noordhuizen & Wentink, 2001).

Um dos fatores fundamentais na prevenção da ocorrência de doenças é a administração de colostro, que é uma das mais importantes fontes de nutrientes essenciais para melhorar a probabilidade de sobrevivência neonatal. Em particular, o colostro contém imunoglobulinas que, quando absorvidas, protegem o vitelo de doenças infecciosas (Cummins *et al.*, 2017).

Contudo, a composição e propriedades físicas do colostro bovino são altamente variáveis devido aos mais diversos fatores, incluindo os processos de preservação usados. Mais de 60% do colostro bovino produzido nos Estados Unidos da América não cumpre os requisitos mínimos considerados adequados (isto é, mais de 50g/L de IgG e um total de contagem bacteriana inferior a 100 unidades formadoras de colónias (UFC)/mL), aumentando a preocupação no que diz respeito à qualidade do colostro (Bartkiene *et al.*, 2018).

Embora os componentes imunitários do colostro sejam essenciais para a saúde do vitelo, a contaminação bacteriana do colostro pode anular alguns desses benefícios (Stewart *et al.*, 2005).

Existem vários estudos referentes à contaminação bacteriana do colostro realizados nos Estados Unidos da América (Fecteau *et al.*, 2002; McGuirk & Collins, 2004; Morrill *et al.*, 2012) e, mais recentemente, um na República Checa (Šlosárková *et al.*, 2021). Contudo, esta é uma área ainda muito pouco abordada na nossa realidade portuguesa.

## 1.1 COLOSTRO

Entende-se por colostro como a substância, de cor amarelada, que é secretada pela glândula mamária durante as primeiras 24 horas após o parto. A sua administração logo após o nascimento é um procedimento fundamental, visto ser um alimento com elevado valor nutritivo e de alta digestibilidade para o neonato (Potter, 2011).

O colostro bovino é composto por gordura, hidratos de carbono, proteínas (onde têm um grande valor as imunoglobulinas), vitaminas e minerais (Bovine Alliance on Management & Nutrition, 2001; Barros, 2015). Para além destes, é ainda rico em fatores de crescimento e hormonas que estimulam o crescimento e desenvolvimento do trato digestivo e outros órgãos (National Research Council, 2001; Mann *et al.*, 2016), citocinas, células do sistema imunitário materno, fatores anti-microbianos não específicos (lactoferrina, lactoperoxidase) (Maunsell, 2014; Dairy Australia, 2017) e inibidores enzimáticos que fornecem aos anticorpos proteção contra a digestão intestinal (Bovine Alliance on Management & Nutrition, 2001).

### 1.1.1 Propriedades Nutritivas

O colostro, em comparação com o leite, apresenta maiores quantidades de proteína, gordura, minerais e vitaminas, contendo, por outro lado, menores quantidades de lactose. Esta menor concentração de lactose no colostro evita a ocorrência de diarreias, visto o neonato não ter capacidade para digerir grandes quantidades da mesma (Maunsell, 2014).

Os vitelos nascem com baixas reservas energéticas (Hoard's Dairyman, 1990), correspondendo os lípidos apenas a 3% do peso corporal (Mann *et al.*, 2016). A administração de colostro permite fornecer ao animal glucose (ou precursores desta) e energia, favorecendo a obtenção da sua termorregulação e homeostasia após o nascimento (Barros, 2015).

A gordura é a principal fonte de energia para o neonato (Hoard's Dairyman, 1990), estimando-se que as reservas lipídicas endógenas asseguram o metabolismo do vitelo durante as primeiras 15 horas de vida (Barros, 2015).

Já a proteína presente no colostro é responsável pelo fornecimento de aminoácidos essenciais à síntese proteica, sendo fundamental para o estabelecimento da homeostasia do animal (Barros, 2015). Para além de contribuir para a regulação da temperatura, a proteína existente, nomeadamente as imunoglobulinas, providenciam defesas imunitárias ao neonato (Quigley & Drewry, 1998).

Relativamente às vitaminas A e E, o vitelo apresenta um déficit das mesmas à nascença, sendo este colmatado mediante o consumo de colostro (Weaver *et al.*, 2000; Barros, 2015). Este último é assim necessariamente rico em vitaminas (A, E e B<sub>12</sub>) e minerais, fornecendo quantidades adequadas de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e zinco (House *et al.*, 2015), demonstrando-se, porém, deficitário em ferro, cobre e manganês (Mann *et al.*, 2016).

### **1.1.2 Propriedades Imunológicas**

A placenta materna garante a sobrevivência do feto através do fornecimento de nutrientes e de oxigénio durante a gestação, remoção de produtos provenientes do catabolismo do vitelo, bem como a sua proteção contra microrganismos (House *et al.*, 2015; Germano, 2017). Porém, o facto de a placenta existente nos bovinos ser epiteliocorial impede a transferência de imunoglobulinas (ou anticorpos) para o feto, por existir uma separação do sangue materno e fetal (Quigley & Drewry, 1998; Tao & Dahl, 2013).

As imunoglobulinas são proteínas que correspondem a cerca de 70% a 80% das proteínas totais (PT) do colostro (Borad & Singh, 2018)) e são produzidas em resposta à estimulação de um antigénio e que, mais tarde, têm como função a destruição do mesmo (Armengol & Fraile, 2016).

Assim sendo, o colostro tem um papel fundamental devido à sua riqueza em imunoglobulinas, tornando-se a principal fonte das mesmas para o neonato. A transferência destes componentes via colostro é designada por transferência passiva de imunidade (Heinrichs & Jones, 2003; Dunn *et al.*, 2017). No colostro bovino temos maioritariamente três tipos de imunoglobulinas: imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina M (IgM) (Heinrichs & Elizondo-Salazar, 2009). Destes três tipos, a IgG está presente em maiores concentrações, sendo também a que permanece por mais tempo na corrente sanguínea do vitelo (Solomons, 2002; Dunn *et al.*, 2017).

Quanto à sua função, cada imunoglobulina possui uma forma diferente de atuar no organismo do vitelo: a IgG é a mais importante, contribuindo para a identificação e destruição dos microrganismos patogénicos, evitando assim possíveis infeções; a IgM é tida como a primeira linha de defesa do organismo quando o animal é exposto pela primeira vez a um antigénio, protegendo contra uma possível invasão bacteriana, mas apresentando por isso baixa

especificidade e reduzido poder de combate à infecção; e a IgA tem como principal função a proteção da mucosa intestinal, visto que a sua ligação à mesma impede a adesão de microrganismos (Stelwagen *et al.*, 2009). A IgG é transportada desde a corrente sanguínea até ao colostro, iniciando-se este processo 2 a 3 semanas antes do parto, enquanto a IgA e a IgM são sintetizadas diretamente pelas células plasmáticas da glândula mamária (Potter, 2011).

A produção endógena de anticorpos por parte do vitelo tem início a partir das 36 horas de vida (Hurley & Theil, 2011). Apesar de possuir um sistema imunitário competente, a quantidade de imunoglobulinas produzidas nas primeiras três semanas de vida – 1g de IgG por dia – não é suficiente para assegurar a proteção do vitelo, estando, portanto, dependente das imunoglobulinas maternas (Quigley & Drewry, 1998; Hurley & Theil, 2011). Estas começam a desaparecer gradualmente 24h após a toma de colostro (Mejer, 2015) até terminarem a sua atividade nas três primeiras semanas, passando o animal a estar dependente da produção do seu sistema imunitário, que só se encontra completamente funcional entre o primeiro e o segundo mês de idade (Hurley & Theil, 2011). A aquisição de imunoglobulinas através do colostro ocorre através da capacidade de absorção dos enterócitos (Quigley & Drewry, 1998; Heinrichs & Jones, 2003; Dunn *et al.*, 2017), que permitem captar macromoléculas de origem proteica, por um processo de pinocitose (Quigley & Drewry, 1998; Hurley & Theil, 2011). Se o colostro não for administrado ao neonato nas primeiras 24 horas de vida, é-lhe impossibilitada a aquisição da quantidade de imunoglobulinas necessária à sua sobrevivência (Dunn *et al.*, 2017).

Relativamente à quantidade de proteínas existentes na corrente sanguínea de um neonato, este contém cerca de 4,0 g/dL, sendo estas proteínas de transporte, albuminas, entre outras, mas praticamente nenhuma são imunoglobulinas. Deste modo, existe uma correlação muito próxima entre o total de proteínas e as imunoglobulinas presentes no sangue, após a toma de colostro, visto que a maioria das proteínas presentes no mesmo é deste tipo. Esta correlação, em vitelos com 24 horas de vida, é de aproximadamente 0,71, o que significa que cerca de 50% da variação de proteínas totais no sangue pode ser atribuída à fração de imunoglobulinas (Franklin *et al.*, 2003).

A constituição quer imunológica, quer nutricional, está evidenciada e resumida na seguinte Tabela 1.

Tabela 1 – Constituição do Colostro (Adaptado de Foley & Otterby, 1978; Hammon *et al.*, 2000)

PARÂMETRO	COLOSTRO	LEITE DE TRANSIÇÃO (PÓS-PARTO)		LEITE
	1	2	3	6
GRAVIDADE ESPECÍFICA	1,056	1,040	1,035	1,032
SÓLIDOS TOTAIS (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
GORDURA (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
PROTEÍNA TOTAL (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
CASEÍNA (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
ALBUMINA (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
IMUNOGLOBULINAS (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
IGG (G/100ML)	3,2	2,5	1,5	0,06
LACTOSE (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
IGF-I (µG/L)	341	242	144	15
INSULINA (µG/L)	65,9	34,8	15,8	1,1
CINZAS (%)	1,11	0,95	0,87	0,74
CÁLCIO (%)	0,26	0,15	0,15	0,13
MAGNÉSIO (%)	0,04	0,01	0,01	0,01
ZINCO (MG/100ML)	1,22	-	0,62	0,3
MANGANÊS (MG/100ML)	0,02	-	0,01	0,004
FERRO (MG/100G)	0,20	-	-	0,05
COBALTO (µG/100G)	0,5	-	-	0,10
VITAMINA A (µG/100ML)	295	190	113	34
VITAMINA E (µG/G DE GORDURA)	84	76	56	15
RIBOFLAVINA (µG/ML)	4,83	2,71	1,85	1,47
VITAMINA B12 (µG/100ML)	4,9	-	2,5	0,6
ÁCIDO FÓLICO (µG/100ML)	0,8	-	0,2	0,2
COLINA (MG/ML)	0,7	0,34	0,23	0,13

A quantidade de imunoglobulinas adquiridas pode ser monitorizada através da extração de sangue no recém-nascido e posterior análise do soro com recurso a um refratômetro de proteínas séricas. A extração do sangue do vitelo deve ocorrer após as 24 horas de vida, para assegurar a absorção total das imunoglobulinas, e antes das 48 horas de vida, de forma a diminuir a interferência de outras proteínas da dieta (Dias, 2016). Caso o neonato, entre as 24 e as 48 horas de vida, apresente uma concentração de proteína total no soro inferior a 5,5 g/dL, considera-se que houve falha de transmissão passiva (Weaver *et al.*, 2000; Deelen *et al.*, 2014). Para considerarmos que houve uma correta transferência passiva de imunidade da vaca para o recém-nascido via colostro, a concentração de IgG no soro do vitelo deve exceder 10g/L nos primeiros dias de vida (Patel *et al.*, 2014; Godden *et al.*, 2019).

É do interesse do produtor obter uma ótima transferência de imunidade passiva, pois esta encontra-se associada a menor mortalidade e morbidade e, conseqüentemente, menores custos veterinários até ao desmame, melhores ganhos de peso, melhores performances e permite que o animal permaneça mais tempo na exploração (Armengol & Fraile, 2016).

## 1.2 COLHEITA DE COLOSTRO

A concentração de imunoglobulinas no colostro é mais elevada imediatamente a seguir ao parto, porém começa a decrescer conforme se for atrasando a sua ordenha. A colheita de colostro, para obter a melhor qualidade possível, deve ser efetuada dentro de 1 a 2 horas após o parto, até às 6 horas seguintes ao mesmo (Godden *et al.*, 2019). Segundo um estudo de Logue & Mayne (2014), efetuar a colheita de colostro 6 horas, 10 horas ou 14 horas após o parto, resulta em 17%, 27% e 33% de diminuição na concentração colostrual de imunoglobulinas, respetivamente.

A contaminação do colostro, aquando da sua colheita, pode ser evitada se for tida em conta a realização de uma ordenha em condições de higiene, pelo que se verifica que, se o colostro for retirado diretamente do úbere do animal, as contagens bacterianas são muito baixas quando comparadas com as contagens em amostras retiradas de um balde (Donahue *et al.*, 2012). Para além da ordenha em si, é muito importante prevenir a contaminação da glândula mamária, assegurando a saúde e bem-estar da vaca, através de protocolos de vacinação e manejo corretos (Stewart *et al.*, 2005).

### 1.3 ARMAZENAMENTO DE COLOSTRO

O colostro é a principal fonte de agentes infecciosos para o neonato (Moore *et al.*, 2005), pois pode conter bactérias provenientes da glândula mamária da vaca, bem como agentes patogênicos ambientais que contaminam o colostro durante a sua colheita, armazenamento ou administração (Godden *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Donahue *et al.*, 2012).

O armazenamento de colostro é uma prática comum, permitindo manter uma reserva do mesmo quando a administração do colostro materno é impraticável ou quando este é de fraca qualidade. Os métodos mais comuns de armazenamento são a temperatura ambiente, a refrigeração e a congelação, tendo estas práticas demonstrado que não interferem com a concentração de imunoglobulinas presente no colostro ou no soro do recém-nascido (Morrill *et al.*, 2012; Diniz, 2017).

Caso o colostro apresente sinais de acidificação, a qualidade do mesmo já se encontra afetada, sendo que as imunoglobulinas serão degradadas pelas bactérias, reduzindo os níveis de imunidade que o colostro poderia e deveria providenciar (Sims *et al.*, 2015).

#### 1.3.1 Temperatura Ambiente

Não se pode considerar efetivamente que, numa exploração, se armazene colostro à temperatura ambiente, visto que a sua riqueza nutricional e temperatura o tornam num excelente meio para o crescimento de bactérias, dando origem a um aumento na contagem de coliformes e bactérias totais (Donahue *et al.*, 2012). Mantendo-se o colostro à temperatura ambiente, observa-se um aumento da contagem bacteriana total, atingindo-se no período de duas horas pós-colheita 230 milhões UFC/mL (Richards, 2015). A permanência do colostro à temperatura ambiente só deve ocorrer caso este seja fornecido ao vitelo no espaço de uma hora após a sua colheita. Caso contrário, deverá ser refrigerado ou congelado (Brown, 2016).

#### 1.3.2 Refrigeração

Procede-se à refrigeração do colostro quando este não é necessário no momento, mas poderá vir a ser utilizado passados alguns dias. Este tem que ser colocado o mais rapidamente possível à temperatura de 4°C, podendo manter-se a esta temperatura por mais de 96 horas, quando lhe é adicionado um conservante, como o sorbato de potássio, que permite manter reduzidas as contagens bacterianas (Arede, 2013). Após uma semana de armazenamento a 4°C,

verifica-se uma diminuição da qualidade do colostro devido à perda das imunoglobulinas (Barros, 2015).

### **1.3.3 Congelação**

Recorre-se à congelação quando se pretende armazenar o colostro por períodos mais longos de tempo, sendo que o mesmo se mantém a temperaturas compreendidas entre os  $-18^{\circ}\text{C}$  e os  $-20^{\circ}\text{C}$ , podendo ser utilizado no prazo de um ano sem que a sua qualidade seja comprometida (Meganck *et al.*, 2014; Brown, 2016). Utilizando este processo, é fundamental proceder à descongelação do colostro com todo o cuidado, para evitar a desnaturação das proteínas, nomeadamente das imunoglobulinas. Esta descongelação deve então ser realizada lentamente, recorrendo a água morna, com temperatura abaixo dos  $50^{\circ}\text{C}$ , para assegurar a preservação da qualidade (Franklin *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2013).

Os recipientes que contêm as amostras deverão ser devidamente identificados com o número da vaca que deu o colostro e a data em que este foi retirado (Stewart *et al.*, 2005). Segundo um estudo de Lorenz *et al.* (2011), o fornecimento de colostro congelado e fresco não provocou diferenças ao nível da absorção de imunoglobulinas.

## **1.4 ADMINISTRAÇÃO DE COLOSTRO**

A administração de uma quantidade adequada de colostro de elevada qualidade no momento correto após o parto é de extrema importância para a sobrevivência, saúde e futura produtividade do neonato (Stewart *et al.*, 2005).

### **1.4.1 Quantidade**

Para obtermos sucesso na transferência passiva de imunidade ao vitelo ( $>10$  mg de IgG/mL de soro (Patel *et al.*, 2014; Godden *et al.*, 2019)), é recomendado que este receba no mínimo 150 a 200 g de IgG nas primeiras duas horas de vida (Chigerwe *et al.*, 2008). Estes valores normalmente são obtidos através da ingestão de 3 a 4 L de colostro de alta qualidade ( $>50$  mg de IgG/mL) (McGuirk & Collins, 2004).

Um estudo realizado por Quigley (2001a) permitiu a comparação do efeito provocado por diferentes volumes de colostro na aquisição de imunidade pelo vitelo. Neste estudo, foram

criados três grupos de animais aos quais foram fornecidos 7%, 8,5% e 10% do peso vivo em colostro. Verificou-se que os vitelos que beberam 8,5% do seu peso em colostro obtiveram maiores concentrações de imunoglobulinas no soro que os vitelos dos outros grupos, sendo que entre estes últimos (7% e 10%) não se observaram diferenças.

É importante perceber que, para se obter a transferência passiva pretendida, deve-se ter em conta, não só a quantidade de imunoglobulinas, mas também a qualidade do colostro a administrar, e o peso e idade do vitelo à primeira toma (Anderson, 2011).

Para se calcular a quantidade de imunoglobulinas necessárias, é preciso assumir o objetivo de atingir uma concentração mínima de 10mg de IgG por 1mL de soro. Ao considerar que, às 24 horas de idade, o volume de plasma corresponde a 9% do peso do animal (em média ronda os 40kg de peso vivo), este deve consumir 36g de IgG. Contudo, as IgG não são absorvidas a 100%, estando a sua eficácia de absorção próxima dos 35%. Assim sendo, para se alcançarem os 10mg/mL, o vitelo deve consumir 103 gramas de IgG. Porém, como margem de segurança e assumindo um objetivo de concentração de IgG no soro de 15mg/mL, o vitelo necessita de ingerir 154 gramas das mesmas (Anderson, 2011).

#### **1.4.2 Idade do recém-nascido**

A idade a que o vitelo recebe o colostro é de extrema importância por duas razões: o curto período de tempo em que o vitelo absorve macromoléculas e o potencial de colonização de bactérias patogénicas no intestino (Dunn *et al.*, 2017).

Dado que o neonato nasce sem qualquer tipo de defesas contra microrganismos, é fundamental que haja absorção das imunoglobulinas do colostro pelas células da mucosa intestinal. Porém, após a primeira hora de vida, verifica-se uma progressiva perda de capacidade de absorção, observando-se uma quebra de 30 a 50% nas primeiras 6 horas de vida (Holloway *et al.*, 2001).

Os atrasos na administração de colostro não só causam uma diminuição da absorção do mesmo, como podem levar a doença ou morte do vitelo, caso as bactérias colonizem o intestino antes da chegada de imunidade (Dairy Australia, 2020).

Deste modo, a eficiência de absorção de imunoglobulinas é ótima nas primeiras 4 horas de vida, sendo que o ideal é a administração de colostro ser realizada entre a primeira e a segunda horas de vida (Godden *et al.*, 2019).

### 1.4.3 Método de Toma

O método usado na primeira administração de colostro pode ser influenciado pelo momento em que se realiza a mesma e pode influenciar o volume administrado e a eficiência de absorção de imunoglobulinas (Godden *et al.*, 2019).

Existem três métodos comumente utilizados na administração do colostro: ingestão direta do úbere da vaca, por biberão e por sonda (Conneely *et al.*, 2014).

A ingestão direta do úbere da vaca através da sucção por parte do neonato apresenta várias desvantagens, entre elas o facto de muitos vitelos terem maior dificuldade e levarem mais tempo a se conseguirem levantar, principalmente aqueles que são grandes e nascem após partos complicados. Consequentemente à complicação do parto, também muitos deles podem não conseguir encontrar o úbere ou os tetos, aumentando a probabilidade de ingestão de material conspurcado como a cama (ou até mesmo fezes) que contém agentes patogénicos, para além do facto de não ser possível controlar a qualidade e quantidade adquiridas de colostro, nem o tempo após o parto que o neonato leva para o ingerir (Dairy Australia, 2020). Segundo Besser *et al.* (1991), para um neonato adquirir a quantidade mínima de colostro para a obtenção da imunidade, isto é 2L, deveria encontrar-se a mamar por um período de 20 minutos, o que não é possível controlar no quotidiano de uma exploração.

Quando existe um colostro com menor quantidade de imunoglobulinas e um volume mais pequeno, pode-se recorrer à administração através de biberão que permite uma absorção de IgG's superior do que a verificada com a entubação, uma vez que o biberão estimula o reflexo de sucção do neonato, apesar de ser um método mais demorado (Aguirre *et al.*, 2013), o que possibilita a ativação da goteira esofágica e a deposição do colostro imediatamente no omaso e abomaso, reduzindo o tempo compreendido entre a administração de colostro e a chegada do mesmo ao intestino para absorção das imunoglobulinas (McGuirk, 2010).

Já a administração através de uma sonda esofágica permite uma maior rapidez na administração de fluídos, apresentando contudo alguns riscos para a saúde do vitelo, como danos físicos na faringe ou esófago, aspiração para os pulmões, acidose ruminal ou estabelecimento de condições de anaerobiose nos compartimentos gástricos anteriores (Ohnstad, 2021). Outro senão deste método é o facto de não ativar a goteira esofágica, resultando no depósito temporário de colostro no rúmen e retículo, sendo geralmente direccionado para o abomaso dentro das 3 horas seguintes à administração (Godden *et al.*, 2019).

#### 1.4.4 Qualidade

A questão da qualidade é fundamental na capacidade de absorção de imunoglobulinas por parte do neonato, incidindo-se neste ponto fulcral o tema do meu trabalho.

Pode-se considerar que existem dois fatores que influenciam a qualidade do colostro: a concentração de imunoglobulinas (principalmente as IgG's) e a quantidade de bactérias presente (Dunn *et al.*, 2017).

##### 1.4.4.1 Qualidade Imunológica

Relativamente à concentração de imunoglobulinas no colostro, existem vários fatores que a influenciam, tais como:

- Duração do período seco da vaca: para se atingir uma concentração suficiente de anticorpos no colostro, é necessário um período de secagem de cerca de 3 a 4 semanas (Dunn *et al.*, 2017). O colostro de vacas que não tiveram período de secagem tem uma concentração de IgG menor, quando comparadas com vacas que tiveram um período seco de 28 a 56 dias (Arede, 2013).
- Nutrição no período pré-parto: vacas que são alimentadas com quantidades reduzidas de proteína ou energia produzem colostro de qualidade inferior, quando comparadas com vacas alimentadas adequadamente (Dunn *et al.*, 2017).
- Idade da vaca: animais que já pariram 3 ou mais vezes, têm maiores níveis de imunoglobulinas por litro do que novilhas ou vacas de segunda lactação, o que está relacionado com uma maior exposição a agentes patogénicos, refletindo-se no facto de vitelos nascidos de novilhas terem maior probabilidade na falha na imunidade passiva (Arede, 2013).
- Quantidade de colostro produzido na primeira ordenha: as vacas que produzem grandes quantidades de colostro apresentam por vezes teores reduzidos de imunoglobulinas, provavelmente devido a um efeito de diluição (Dunn *et al.*, 2017).
- Tempo da primeira ordenha: a concentração de IgG no colostro decresce cerca de 3,7% a cada hora após o parto, sendo por isso o fator mais importante, no que diz respeito à qualidade, em que o produtor consegue interferir (Aguirre *et al.*, 2013). O colostro que é recolhido 2 horas após o parto tem concentrações de IgG significativamente menores, provavelmente devido a um efeito de diluição e porque

as imunoglobulinas do colostro se difundem passivamente para a circulação sistêmica da vaca, caso esta não seja ordenhada imediatamente após o parto (Arede, 2013).

- Raça: a concentração de imunoglobulinas no colostro de vacas de carne é normalmente superior ao das vacas de produção de leite, apresentando valores, na maioria dos estudos, bastante superiores a 10 g/dL, permitindo uma transferência de imunidade passiva adequada, desde que a administração do colostro seja supervisionada (Aguirre *et al.*, 2013), sendo muitas vezes suficiente a administração de 1L de colostro a vitelos de carne. Comparando raças de produção de leite, as *Jersey* tendem a ter os níveis mais elevados de imunoglobulinas, enquanto as *Holstein* apresentam os valores mais baixos (Dunn *et al.*, 2017).
- Vacinação: existem vacinas que se administram no período seco das vacas com o intuito de aumentar os anticorpos presentes no colostro contra antigénios específicos, aumentando a qualidade do mesmo (Roussel, 2009). Um aumento na produção de imunoglobulinas ocorre sensivelmente 10 a 14 dias após a vacinação, levando à produção de um colostro com concentrações superiores de imunoglobulinas. A vacinação do efetivo na sexta semana anterior ao parto providenciará tempo suficiente para a produção de anticorpos e a transferência dos mesmos do soro para o colostro (Cortese, 2009). As vacinas disponíveis para administrar no período seco da vaca pretendem atuar contra rotavírus, coronavírus, *Clostridium spp.* e *Escherichia coli* (Dunn *et al.*, 2017).

#### 1.4.4.2 Qualidade Microbiológica

No que concerne à contaminação microbiológica do colostro, existem estudos que mostram uma relação entre esta e a absorção de imunoglobulinas por parte dos neonatos (McGrath *et al.*, 2016; Renaud *et al.*, 2017; Godden *et al.*, 2019;). Existem três hipóteses que descrevem a forma como os microrganismos influenciam a aquisição de imunidade por parte do vitelo. Uma primeira hipótese indica que a presença de bactérias leva a que as imunoglobulinas presentes no colostro se liguem às mesmas, levando a uma menor absorção de imunoglobulinas por parte do neonato (Moore *et al.*, 2005; Elizondo-Salazar *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2013). A segunda hipótese indica que os microrganismos são capazes de estabelecer ligação com os recetores não específicos da mucosa intestinal, dificultando assim a

absorção de imunoglobulinas (Moore *et al.*, 2005; Elizondo-Salazar *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2013). Uma terceira hipótese sugere que as bactérias induzem a destruição das células da mucosa intestinal com capacidade de absorção (Elizondo-Salazar *et al.*, 2010).

A exposição do animal aos microrganismos pode provocar diarreias e septicemias (Gelsinger *et al.*, 2015; Godden *et al.*, 2019).

A contagem bacteriana total não deve exceder as 100.000 UFC/mL e a contagem de coliformes fecais deve ser inferior a 10.000 UFC/mL (McGuirk & Collins, 2004; Aguirre *et al.*, 2013). Segundo Mendonsa (2011), colostros com contagens bacterianas inferiores a 100.000 UFC/mL têm uma maior eficiência de absorção de imunoglobulinas, comparados com colostros com contagens superiores.

Na prática, a contaminação bacteriana pode ser provocada por falta de higiene na preparação do úbere para a colheita do colostro, por alguma infecção da glândula mamária, equipamento de ordenha com falhas sanitárias, falha no protocolo de armazenamento do colostro ou contaminação do equipamento para administração do mesmo (Williams *et al.*, 2014).

## 1.5 AGENTES PATOGÊNICOS DE COLOSTRO

Podemos dividir os diferentes microrganismos encontrados no colostro tendo em conta a provável origem da contaminação: agentes patogênicos estritamente de origem na glândula mamária como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus*; microrganismos presentes na pele e mucosa, incluindo *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp; contaminantes fecais, como *Enterococcus* spp., *Streptococcus bovis*, *Proteus* spp., *Escherichia coli* e outros coliformes (*Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.); e ainda contaminantes ambientais, incluindo *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e bastonetes gram-negativos (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp.) (Poulsen *et al.*, 2010). De acordo com Fecteau *et al.* (2002), num estudo realizado no Canadá, com 234 amostras de colostro, os microrganismos maioritariamente encontrados foram: *Staphylococcus* spp, em 57,7% das amostras, bastonetes gram-negativos em 47,9%, coliformes em 44% e *Streptococcus uberis* em 20,5%. Verificou-se ainda pelo menos um tipo de microrganismo em 94,4% das amostras.

Outros agentes passíveis de serem transferidos através do colostro são *Mycoplasma* spp, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Steele *et al.*, 1997; Donahue *et al.*, 2012; McAloon *et al.*, 2016; Godden *et al.*, 2019).

## 1.6 PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COLOSTRO

Se a administração de colostro é um fator tão importante na obtenção de saúde por parte do recém-nascido, então o primeiro passo para o atingir é prevenir a contaminação do mesmo (Donahue *et al.*, 2012).

Existem processos inerentes à colheita, conservação e administração que são essenciais no crescimento e multiplicação de agentes patogénicos no colostro.

### 1.6.1 Colheita de Colostro

Durante a colheita, existem algumas fontes de contaminação, como a pele do teto, tetinas, mangueiras ou o balde de recolha do leite (Donahue *et al.*, 2012).

Donahue *et al.* (2012) verificou que 100% das amostras colhidas assética e diretamente do úbere das vacas apresentaram valores inferiores a 100.000 UFC/mL de contagem total bacteriana, sendo que se verificou um aumento significativo deste parâmetro do mesmo colostro colhido posteriormente do balde de recolha.

### 1.6.2 Armazenamento de Colostro

Após a colheita, caso o colostro não seja administrado ao recém-nascido, deve ser armazenado o mais rápido possível. Quigley (1997) demonstrou que, após 20 minutos à temperatura ambiente, se verifica um crescimento significativo de coliformes e da contagem total bacteriana.

Desta forma, é indicada a sua refrigeração ou congelação dentro da primeira hora seguinte à ordenha (Godden *et al.*, 2019).

Apesar de se indicar a refrigeração por períodos de 7 dias, Donahue *et al.* (2012) e Poulsen *et al.* (2002) verificaram a ocorrência de um aumento do crescimento bacteriano e uma redução do pH em colostro refrigerado após um período de 96 horas.

Segundo Cummins *et al.* (2016), o colostro refrigerado apresenta valores elevados de contagem de coliformes e de contagem total de bactérias, ao contrário do colostro fresco e congelado.

### **1.6.3 Temperatura Ambiental**

A época do ano tem grande influência na contaminação do colostro, devendo-se ter em conta que, em épocas mais quentes, o crescimento bacteriano ocorre de forma mais rápida e acentuada do que nas épocas mais frias (Poulsen *et al.*, 2010; Morrill *et al.*, 2012). Deste modo, é crucial uma maior preocupação em agilizar os processos de conservação e administração do colostro em meses mais quentes (Poulsen *et al.*, 2010).

### **1.6.4 Administração de Colostro**

Os equipamentos utilizados para administração de colostro podem ser meios de contaminação bacteriana do colostro. Um estudo de Morrill *et al.* (2012) demonstrou que a maioria dos equipamentos se apresentavam com contagens bacterianas totais elevadas e mais de 20% das amostras demonstravam valores elevados de contagem de coliformes. Verificaram também que a avaliação visual dos equipamentos é um fraco indicador da contaminação desses equipamentos, levando à ocorrência de falsos negativos, o que faz com que não seja realizada efetivamente uma correta higienização dos materiais.

Neste estudo, observou-se também que as sondas e os biberões apresentavam maiores contagens bacterianas totais, enquanto os baldes apresentavam maiores contagens de coliformes (Morrill *et al.*, 2012).

## **1.7 PLANO HIGIÊNICO E MEDIDAS PREVENTIVAS**

### **1.7.1 Colheita de Colostro**

O tempo decorrido entre o parto e a primeira ordenha para colheita de colostro, para além de ser um fator preponderante na quantidade de imunoglobulinas presente no mesmo, é fundamental na contaminação deste, visto que quanto mais tempo o animal estiver sem

ordenhar, maior é o risco de estar em contacto com microrganismos que podem depois estar presentes no colostro (Santos *et al.*, 2017).

É fulcral fazer uma limpeza adequada do úbere da vaca antes de qualquer colheita, sendo recomendado um procedimento de quatro etapas (Richards, 2015):

- Limpar os resíduos soltos de cada quarto do úbere.
- Aplicar pré-dipping em cada teto e limpar com uma toalha limpa.
- Aplicar novamente pré-dipping e esperar 30 segundos.
- Passar novamente uma toalha limpa, esfregando as pontas de cada teto.

Não se pode descurar também de uma correta limpeza dos equipamentos de recolha de colostro, incluindo os baldes, mangueiras, válvulas, tampas e juntas. Para isso, de cada vez que o equipamento é usado, deve-se proceder ao seguinte maneiio:

- Enxaguar com água quente.
- Escovar os materiais com uma solução de cloro.
- Enxaguar novamente.
- Deixar secar.

O uso de um equipamento de ordenha portátil facilita a colheita de colostro sem ter de mover a vaca, permitindo alimentar o neonato o mais rápido possível. Ter um equipamento específico somente para a colheita de colostro permite manter a unidade estéril mais facilmente (Santos *et al.*, 2017). Se o balde de recolha for de aço inoxidável, é mais fácil proceder à sua limpeza (Holloway *et al.*, 2001).

Assim como os equipamentos de recolha de colostro, também os baldes onde o colostro é depositado após a ordenha devem ser lavados e desinfetados após cada uso. Estes equipamentos devem possuir tampas para evitar a sua conspurcação antes, durante e após a ordenha (Santos *et al.*, 2017).

### **1.7.2 Pasteurização**

Um dos métodos cada vez mais utilizados para reduzir ou eliminar agentes patogénicos no colostro é a pasteurização.

Os métodos de pasteurização reduzem a contagem de bactérias, preservam as concentrações de IgG e aumentam a eficácia de absorção das mesmas (Aguirre *et al.*, 2013). Os vitelos alimentados com colostro pasteurizado têm níveis superiores de IgG no soro, valores de proteínas sérica e/ou maior eficiência de absorção, quando comparados com vitelos que ingeriram colostro que não foi pasteurizado (Arede, 2013). Um estudo de Leadley (2016) demonstrou um decréscimo significativo na contagem total bacteriana e de coliformes de colostro pasteurizado relativamente ao colostro sem qualquer tipo de tratamento.

A pasteurização do colostro elimina efetivamente agentes patogénicos como: *Mycoplasma bovis*, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Heinrichs & Jones, 2003).

Os métodos de pasteurização habitualmente utilizados para o leite levam à redução, por desnaturação, da concentração de IgG e ao aumento da viscosidade do colostro. Contudo, a pasteurização do colostro realizada a 60°C durante 30 a 60 minutos reduz significativamente o seu nível bacteriano sem causar desnaturação das imunoglobulinas (Aguirre *et al.*, 2013).

Vários estudos defendem que a pasteurização aumenta a qualidade do colostro, na medida em que há uma maior absorção de imunoglobulinas por parte dos vitelos, reduzindo assim a percentagem de casos de falha de transferência de imunidade passiva (Heinrichs & Jones, 2003).

### **1.7.3 Armazenamento de Colostro**

O armazenamento de colostro tem o objetivo de prevenir a proliferação bacteriana, podendo-se recorrer à refrigeração, congelação, ou o uso de agentes preservantes, como o sorbato de potássio em colostro refrigerado (Heinrichs & Jones, 2003).

O colostro só deve ser mantido à temperatura ambiente caso seja administrado até uma hora após a colheita, caso contrário, deve ser refrigerado ou congelado o mais rápido possível (Godden *et al.*, 2019).

Para proceder à refrigeração do colostro, deve-se colocá-lo a 4°C por um período máximo de 7 dias, sendo que vários estudos demonstraram que, após 96h, já se verifica proliferação bacteriana (Poulsen *et al.*, 2002; Donahue *et al.*, 2012).

Aconselha-se a conservação do colostro em recipientes com tampa para evitar contaminações adicionais. Para arrefecer o colostro de forma rápida, podem-se colocar alguns

recipientes de plástico limpos com água congelada dentro dos baldes que contêm o colostro quente, sendo que estes recipientes devem ser completamente limpos entre cada uso (Holloway *et al.*, 2001).

Relativamente à congelação, o colostro deve ser mantido entre -18°C e -25°C (Aguirre *et al.*, 2013) e é aconselhado o uso de sacos de armazenamento finos e planos em vez de recipientes de plástico, como as garrafas de refrigerantes, para reduzir os tempos de congelamento e descongelamento (Holloway *et al.*, 2001). Este colostro congelado só deve ser mantido durante 12 meses após a colheita, porque a sua qualidade começa a deteriorar-se a partir daí (Aguirre *et al.*, 2013).

A realização de *pools* de colostro de várias vacas é desaconselhada, quer por causar uma diminuição da concentração de imunoglobulinas, por efeito de diluição (Quigley & Drewry, 1998), quer por levar a um maior número de vitelos potencialmente expostos a agentes patogénicos do colostro (Aguirre *et al.*, 2013).

Um estudo demonstrou que o uso de agentes conservantes como o sorbato de potássio no colostro leva a uma diminuição da taxa de proliferação bacteriana e previne ou atrasa o processo de fermentação de amostras refrigeradas e este método de armazenamento foi o que apresentou menor contagem bacteriana total e de coliformes, relativamente a colostro refrigerado e congelado sem adição de qualquer tipo de conservantes (Donahue *et al.*, 2012).

#### **1.7.4 Administração de colostro**

Os métodos de administração mais comuns são a entubação com uma sonda ou via biberão/balde com tetina. Caso haja um maior volume de colostro e a pessoa responsável pela administração tenha experiência de utilização, este pode ser fornecido por entubação (Aguirre *et al.*, 2013).

Caso os utensílios de administração não sejam corretamente lavados, estes podem ser fonte de transmissão de agentes patogénicos ao vitelo (Godden *et al.*, 2019).

Deste modo, devem-se cumprir com alguns procedimentos básicos para administração de colostro (Holloway *et al.*, 2001):

- Enxaguar os equipamentos com água morna e esfregar para retirar a sujidade e resíduos de leite.

- Lavar com água quente (mais de 50°C) e adicionar um detergente e escovar novamente todas as superfícies para remover os resíduos de leite.
- Pode-se adicionar um desinfetante à base de cloro, consoante indicação no rótulo do produto. Manter o mesmo em contacto com o equipamento durante pelo menos 5 a 10 minutos.
- Enxaguar com água morna, podendo terminar com uma lavagem ácida.
- Colocar os recipientes de forma a escorrerem e secarem, de preferência em prateleiras. Não empilhar baldes uns dentro de outros, nem os colocar virados para baixo em pisos de cimento, pois os resíduos acumulam-se ao redor da borda.
- As tetinas dos biberões devem ser completamente limpas por dentro e por fora, seguindo este protocolo referido acima.
- Descartar as tetinas que estejam rachadas e mostrem marcas de muito uso.
- É uma boa prática substituir as tetinas uma vez por ano (ou antes, se necessário e conforme o uso).

## 2. OBJETIVOS

O colostro administrado a um vitelo desempenha um papel fundamental no seu desenvolvimento. Contudo, este pode ser veículo de transmissão de inúmeros agentes patogénicos. Neste sentido e considerando a qualidade microbiológica, este estudo teve como objetivos:

- A análise e comparação dos seguintes métodos de maneio utilizados em explorações da região Entre Douro e Minho, em Portugal: o maneio do colostro entre o parto e a sua administração, assim como a qualidade e quantidade do mesmo.
- A análise dos métodos de maneio de uma exploração na Catalunha, em Espanha, local onde se procede à pasteurização de colostro.
- A contagem total da carga microbiana e a deteção e identificação de agentes bacterianos, tais como *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* (indicadores de contaminação fecal) e *Staphylococcus aureus*, por métodos microbiológicos, das amostras de colostro das explorações da região Entre Douro e Minho.
- A contagem total da carga microbiana de amostras de colostro da exploração catalã, tendo em conta três fases do processamento do colostro na exploração: a colheita, imediatamente após a sua pasteurização e imediatamente antes da sua administração ao vitelo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CARATERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES

Neste trabalho foram observadas duas realidades diferentes, podendo dividi-lo em dois ensaios: um primeiro em Espanha, numa única exploração, que decorreu durante o mês de novembro de 2019 e um segundo em Portugal, em 13 explorações leiteiras distintas, desde março até dezembro de 2020.

##### 3.1.1 Ensaio 1

Em Tamarite de Litera, na Catalunha, Espanha, o trabalho realizado decorreu na Granja San José, uma exploração leiteira com cerca de 4.000 vacas em produção, ordenhadas 3 vezes por dia, numa ordenha rotativa parcialmente robotizada de 80 lugares. Os animais encontram-se em sistema intensivo e têm uma alimentação à base de silagem de milho e silagem de erva. A exploração apresenta um grupo de equipas especializadas nos trabalhos respetivos, sendo a parte animal liderada por médicos veterinários, como se verifica na área da recria.

Os animais que se encontram a aproximadamente 20 dias da data do parto prevista, são deslocados para uma maternidade em cama de palha, onde se encontram até ao parto. Nessa altura, o vitelo é recolhido para uma cabine individual também em cama de palha, dentro de um vitleiro, onde lhe é administrado o colostro.

Todo o colostro das vacas paridas é recolhido duas vezes ao dia, formando dois *pools* de colostro diários, que são posteriormente pasteurizados a 60°C durante 60 minutos (Figura 1), colocados em luvas de inseminação descartáveis e armazenados no frigorífico (Figura 2). Para a administração do colostro, este é sempre retirado do frigorífico e colocado em banho-maria a 40°C (Figura 3) durante 20 minutos.

Poucas horas após a toma do colostro, o vitelo é movimentado para uma outra box individual no exterior da vacaria, onde permanece até ao desmame.

A alimentação destes vitelos após o colostro é à base de leite de substituição Eurolac Red® e ração *ad libitum*.



Figura 1 - Pasteurizador DairyTech  
(Fonte: Própria)



Figura 2 - Refrigeração do Colostro em  
Luvas de Inseminação no Frigorífico  
(Fonte: Própria)



Figura 3 - Aquecimento do Colostro em Banho-Maria  
(Fonte: Própria)

### 3.1.2 Ensaio 2

Em Portugal, o trabalho realizado decorreu em 13 explorações leiteiras diferentes, na região de Entre Douro e Minho, mais concretamente nos concelhos de Vila do Conde, Póvoa de Varzim e Maia, verificando-se uma realidade muito heterogénea.

Nesta região, temos explorações leiteiras com 30 animais em produção até vacarias com 800 vacas produtoras de leite, sendo a média de 130 animais em produção por exploração. Na maior parte das explorações, os animais encontram-se em regime intensivo, havendo 3 em regime semi-intensivo. De entre as 13 explorações, maior parte apresenta sistemas de ordenha mecanizados, quer seja em espinha de peixe, quer seja em paralelo, enquanto duas delas apresentam robots de ordenha. Nestas duas últimas, a média de ordenhas ronda as 3 diárias, enquanto nas salas de ordenha convencionais só se realizam duas. A base da alimentação dos animais é comum a todas as vacarias, recorrendo à silagem de milho, sendo que a fonte de proteína obtida dos próprios campos varia entre silagem de erva, luzerna e rolos de fenossilagem. Estas explorações são de carácter familiar, sendo sempre um dos membros da família o responsável pela recria, até mesmo na maior exploração observada neste estudo.

No que diz respeito ao alojamento das vacas pré-parto, as vacarias com mais de 150 animais em produção apresentam maternidades coletivas, enquanto as restantes são individuais. As camas variam entre cubículos, cama de serrim ou cama de palha.

Após o parto, todos os produtores retiram o vitelo da proximidade da mãe e colocam-no em recintos com outros vitelos recém-nascidos ou em boxes individuais, sendo que em alguns casos estas se encontravam à altura do chão e noutros estavam elevadas da superfície.

Relativamente ao colostro e como poderemos constatar nos resultados, os métodos de conservação e de administração do colostro variam entre todas as explorações, havendo um ponto em comum, que é o facto de nenhum produtor ter o conceito de ingestão direta de colostro do vitelo na sua mãe como um método fiável de obtenção da quantidade necessária de anticorpos.

Nas duas explorações que realizam pasteurização do colostro, este procedimento ocorre durante 60 minutos a uma temperatura de 60°C.

## 3.2 RECOLHA DE DADOS

### 3.2.1 Ensaio 1

Em Espanha, foram recolhidos dados relativos a 51 animais, aos quais estão associados 13 *pools* de colostro distintos. Na construção da base de dados foram tidos em consideração os seguintes aspetos (Anexo III):

- Dados relativos ao vitelo, como o tamanho (pequeno, médio, grande), sexo (masculino, feminino) e tipo de parto (sem ajuda, com ajuda fácil, com ajuda difícil, cesariana).
- O modo e quantidade de ingestão de colostro (balde com tetina, biberão ou sonda esofágica).
- Horários de parto, ordenha e administração de colostro.
- A qualidade do colostro (avaliada na escala de Brix).
- A concentração de proteína sérica dos vitelos (medida entre as 24h e as 48h de vida).

Relativamente ao colostro, foram colhidas 41 amostras, dividindo-se em três grupos: 13 amostras de colostro antes da sua pasteurização, 13 amostras de colostro imediatamente após a sua pasteurização e 15 amostras de colostro imediatamente antes da sua administração ao vitelo, com o objetivo de obter a contagem total da carga microbiana de cada amostra.

### 3.2.2 Ensaio 2

Na região Entre Douro e Minho, procedeu-se à recolha de 37 amostras de colostro (sendo 5 delas de colostro pasteurizado) de 13 explorações diferentes. O objetivo deste ensaio foi obter a contagem total da carga microbiana de cada amostra, assim como a identificação de agentes patogénicos.

Na construção da base de dados deste ensaio, foram recolhidos os mesmos dados referidos também para o ensaio anterior (Anexo 3).

### 3.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE COLOSTRO

De forma a obter o resultado mais fidedigno possível a nível de contaminação microbiológica e de quantidade de imunoglobulinas do colostro, procedeu-se à recolha de uma amostra de cada colostro imediatamente antes da sua administração, ou seja, de dentro do balde, da ponta do biberão ou da extremidade da sonda esofágica, conforme o método de administração de cada exploração. No ensaio 1, procedeu-se ainda à recolha de amostras antes da pasteurização e imediatamente após a mesma.

Para isso, recorreu-se ao uso de frascos de plástico esterilizados de 100mL e, posteriormente, a seringas descartáveis para extrair 1 a 2 gotas de colostro para medição da qualidade imunológica do mesmo através de um refratómetro digital (Digital Refractometer Kern ORF 85BM, da Kern Optics®), procedendo-se sempre primeiramente à sua calibração com algumas gotas de água destilada (Figura 4).



Figura 4 - Refratómetro Digital Utilizado no Estudo  
(Fonte: Própria)

As amostras foram imediatamente armazenadas no congelador à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  e, aquando da realização das análises laboratoriais, foram transportadas em contentor adequado para manutenção da temperatura.

O valor medido pelo refratómetro na escala de Brix do colostro corresponde a um método indireto para determinação da concentração de IgG's no mesmo, indicando a sua qualidade imunológica. Neste estudo considerou-se o valor de 50g/L como *cut-off* para indicação de um colostro que permita uma transferência suficiente ou não de imunoglobulinas para o vitelo, conforme considerado e recomendado por Godden *et al.* (2019). Segundo Bielmann *et al.* (2010), o valor de 50g de IgG por 1L de colostro corresponde a um valor de 22% na escala de Brix do refratómetro.

### 3.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE

Durante o estudo, as amostras de sangue foram colhidas recorrendo ao uso de uma agulha descartável acoplada a tubos simples de vácuo, sem adição de anticoagulante (Figura 5). Este procedimento foi realizado mediante punção da veia jugular e, posteriormente, as amostras foram armazenadas. Uma vez que o autor desta dissertação não dispunha de acesso a uma centrifugadora, deixaram-se repousar as amostras durante 24 horas, para posterior extração do soro. A refração do mesmo foi executada através do uso de um refratômetro digital, de acordo com as instruções do fabricante, para determinar as concentrações de PT no soro como medida da transferência passiva de imunidade materna. Todas as amostras foram processadas entre 24 a 48h após a sua colheita, tendo em conta que as proteínas se mantêm estáveis em amostras de sangue, durante cerca de 5 dias, desde que protegidas do sol e de temperaturas extremas (McGuirk, 2010).



Figura 5 - Tubos de Vácuo e Seringa Descartável Utilizados no Estudo  
(Fonte: Própria)

Antes da leitura, o refratômetro digital foi calibrado, colocando algumas gotas de água destilada no prisma. O soro sanguíneo foi extraído do tubo com o auxílio de uma pipeta e foram colocadas 1 a 2 gotas no prisma do refratômetro, tendo-se procedido então à sua leitura.

O valor medido pelo refratômetro na escala de Brix do sangue corresponde a um método indireto para determinação da concentração de IgG's no sangue, indicando o sucesso ou não na transferência de imunidade passiva. Neste estudo considerou-se o valor de 5,5g de PT por 1 dL como *cut-off* para indicação de sucesso ou falha nessa transferência de imunidade ao vitelo, conforme considerado e recomendado por Weaver *et al.* (2000). Segundo Weaver *et al.* (2000)

e Deelen *et al.* (2014), o valor de 5,5g/dL de sangue corresponde a um valor de 8,4% na escala de Brix do refratómetro.

A medição da proteína sérica dos vitelos foi realizada tendo em conta os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: vitelos com idades compreendidas entre as 24h e os 3 dias de idade, conforme recomendações de Quigley (2001b).
- Critérios de exclusão: vitelos desidratados ou com uma enteropatia que leve a perda de proteína, conforme recomendações de Hogan *et al.* (2015).

### 3.4 ANÁLISE MICROBIANA

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

#### 3.4.1 Meios de Cultura

Neste estudo, diferentes meios de cultura foram utilizados com diferentes finalidades, tais como, contagem total da carga microbiana, crescimento e isolamento seletivo para cada uma das bactérias pesquisadas, assim como para a preservação das colónias puras obtidas. Para a identificação de algumas resistências a antibióticos, os meios seletivos foram utilizados com e sem a adição de antibióticos específicos.

Para contagem total de microrganismos presentes nas amostras, utilizou-se o seguinte meio de cultura não seletivo Plate Count Agar (PCA, Liofilchem®, Italy). Para a deteção e identificação bacteriana, utilizaram-se os seguintes meios seletivos: Slanetz and Bartley Agar (SB, Liofilchem®, Italy), Kanamycin Aesculin Azide Agar (Esc, Liofilchem®, Italy) e SB + Vancomicina (4µg/ml) para *Enterococcus* spp., e utilizou-se Levine EMB Agar (Levine, Liofilchem®, Italy) e Levine + Cefotaxime (2µg/ml) para *Escherichia coli* (*E. coli*); e Mannitol Salt Agar (MSA, Liofilchem®, Italy) para a deteção de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

(Figura 6), e Chromagar™ Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, CHROMagar, France) para a detecção de MRSA. Posteriormente, foram utilizados mais dois meios de cultura, um para replicação de colónias puras, Brain Heart Infusion Agar (BHI, Liofilchem®, Italy) e um meio para armazenamento dessas colónias puras a -20°C, leite em pó a 20%.

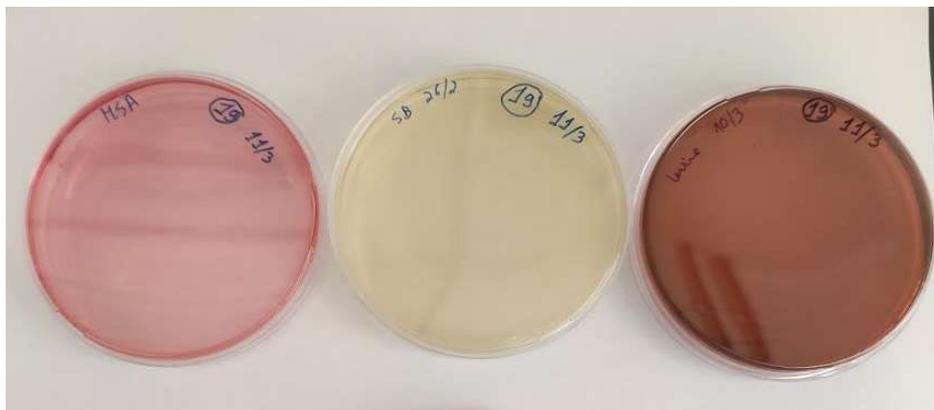


Figura 6 – Os Meios de Cultura Utilizados para a Análise Microbiana (da esquerda para a direita: Mannitol Salt Agar (MSA), Slanetz and Bartley Agar (SB) e Levine EBM Agar (Levine))  
(Fonte: Própria)

Procedeu-se à preparação prévia dos meios de cultura, tendo em conta as instruções do fabricante, realizando os cálculos necessários para obtenção da quantidade de meio para o volume pretendido. Após a preparação destes meios, foram então distribuídos uniformemente por placas de Petri.

Para a preparação e distribuição de cada meio de cultura foi utilizado:

- Colher e recipiente
- Balança de precisão
- Frasco de vidro esterilizado com capacidade suficiente ao volume pretendido
- Proveta
- Meios de cultura
- Água destilada
- Placas de Petri
- Placa de aquecimento magnética
- Barra magnética para agitador (magneto)

- Banho-maria
- Fita autoclave
- Autoclave
- Câmara de fluxo laminar

Procedeu-se à suspensão do agar com o volume de água destilada pretendido num frasco de vidro esterilizado, colocando-se de seguida numa placa de aquecimento com agitação constante até entrar em ebulição. Posteriormente o frasco foi colocado na autoclave, durante 15 minutos a 121°C, com a exceção do meio de leite e MRSA. De seguida, o meio foi colocado em banho-maria até atingir uma temperatura de 50°C (neste momento adiciona-se o antibiótico no caso dos meios de cultura com antibiótico) e numa câmara de fluxo laminar distribuiu-se uniformemente por placas de Petri, devidamente identificadas com indicação do meio de cultura e a data. Realizada a distribuição e arrefecimento das placas, procedeu-se ao seu armazenamento a 4°C para posterior utilização.

### 3.5 INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 3.5.1 Inoculação em PCA para Contagem Total da Carga Microbiana

Em cada amostra, a contagem total de microrganismos presente foi realizada através da inoculação das mesmas em placas de Petri contendo PCA (Figura 7), após a realização de pelo menos três diluições em água destilada até obter a diluição onde permitisse a sua contagem (Johnson *et al.*, 2007).



Figura 7 - Quatro Diluições de PCA com Crescimento (da esquerda para a direita: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000)  
(Fonte: Própria)

Para tal execução, foi necessário o seguinte material:

- Placas de Petri com PCA
- Câmara de fluxo laminar
- Tubos de Eppendorf
- Água destilada esterilizada
- Micropipeta e pontas correspondentes
- Semeador
- Estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )

Numa câmara de fluxo laminar foram realizadas as várias diluições, sendo distribuído por cada tubo de Eppendorf (previamente identificados) 900 $\mu\text{L}$  de água destilada esterilizada. Apenas num dos tubos correspondentes a cada amostra, misturou-se de seguida 100 $\mu\text{L}$  de amostra (diluição 1/10). Realizou-se de seguida a diluição de 1/100, transferindo-se 100 $\mu\text{L}$  para o segundo Eppendorf correspondente a cada amostra, após a homogeneização de cada solução, repetindo o procedimento para a restante diluição (1/1000), descartando do último tubo 100 $\mu\text{L}$  para manter a proporção. Após a realização destas diluições, procedeu-se à inoculação em PCA, transferindo 100 $\mu\text{L}$  de cada tubo de Eppendorf, para o centro da placa de Petri correspondente, com um semeador de forma a obter uma distribuição uniforme da amostra diluída (Figura 8). Por fim, as placas inoculadas foram colocadas na estufa, durante 24h a 37°C, e, decorrido este período, procedeu-se à leitura dos resultados.



Figura 8 - Inoculação da Amostra em Placa de Petri com Meio PCA, utilizando um Semeador  
(Fonte: Própria)

### 3.5.2 Inoculação em Meios Seletivos

Para inoculação das amostras nos meios seletivos anteriormente descritos (MSA, MRSA, Esc, SB, SB+Vancomicina, Levine e Levine+Cefotaxime) utilizou-se o seguinte material: estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), placas de Petri com meios seletivos, ansa de inoculação e bico de Bunsen.

Num ambiente estéril e utilizando uma ansa, as amostras foram inoculadas por estria nas placas de Petri com os respectivos meios seletivos. Após inoculadas, as placas de Petri foram colocadas na estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24h.

### 3.5.3 Identificação Bacteriana

Após a incubação das placas, estas foram analisadas quanto à presença de colônias compatíveis com cada meio de cultura. Sempre que possível, em cada placa com crescimento compatível foram escolhidas 4 colônias isoladas para placas com BHI para serem posteriormente submetidos aos testes microbiológicos de rotina para confirmação e identificação das bactérias em estudo, tais como, *Enterococcus* spp., *E. coli* ou *S. aureus*, resistentes ou não aos antibióticos testados. As placas com crescimento não compatível ou sem crescimento foram excluídas, após registro.

As bactérias cujo resultado foi positivo nos meios específicos, foram submetidas a testes para confirmação e identificação como sendo os seguintes agentes patogênicos apresentados.

#### 3.5.3.1 *Enterococcus*

A identificação de *Enterococcus* spp. resulta do crescimento de colônias compatíveis em SB e/ou SB+Vancomicina e dos resultados obtidos nos seguintes testes específicos: coloração de Gram (+), esculina (+), catalase (-) e NaCl a 6,5% (+).

A coloração Gram permite distinguir uma bactéria Gram-negativa de uma Gram-positiva como é o caso de *Enterococcus* spp., que obtêm uma cor azul/violeta e ainda fornece informação quanto à morfologia da bactéria (cocos ou bacilos, entre outras).

O meio Kanamycin Aesculin Azide Agar que permite diferenciar *Enterococcus* spp. de *Streptococcus* spp., no caso de *E. faecalis* o resultado seria positivo se ocorrer a hidrólise da esculina, com crescimento de colônias com formação de um halo preto característico.

Tal como este, o teste NaCl a 6,5% que também distingue *Enterococcus* spp. de *Streptococcus* spp., na presença de *E. faecalis* apresenta crescimento, tornando a solução turva.

### 3.5.3.2 *Escherichia coli*

As colónias com resultado positivo nos meios Levine e Levine+Cefotaxime para identificação de *E. coli*, foram sujeitas aos seguintes testes: coloração de Gram (-), meio de cultura MacConkey agar (+), meio de cultura HiCrome™ *E. coli* agar (+), catalase (+), oxidase (-), SIM (Sulfur, Indol, Motility Agar) (-, +, +) e TSI (Triple Sugar Iron Agar) (+).

O meio de cultura MacConkey Agar é usado para diferenciar bactérias Gram-negativas, como a *E. coli* baseado na fermentação da lactose. O meio de cultura HiCrome™ *E. coli* agar é um meio seletivo para coliformes e especificamente *E. coli*.

O teste SIM permite determinar a capacidade da bactéria em metabolizar o triptofano em Indol, pela adição do reagente de Kovacs, observando-se no caso da *E. coli* a formação de Indol, anel de cor vermelha formado à superfície. Para além que este teste também permite caracterizar a bactéria quanto à sua mobilidade; no caso da *E. coli* apresenta crescimento para além do local de inoculação.

O teste TSI permite a identificação de bactérias Gram-negativas com base na fermentação de três carboidratos, glicose, lactose e sacarose. No caso da *E. coli* ocorre a fermentação de todos estes açúcares.

### 3.5.3.3 *Staphylococcus aureus*

A identificação das colónias compatíveis com *S. aureus*, das quais apresentaram crescimento nos meios MSA (Figura 14) e/ou MRSA, foram submetidas aos seguintes testes: coloração de Gram (+), catalase (+), DNase (+) e meio de cultura agar-sangue (+).

O teste da catalase tem como finalidade testar se a bactéria produz a enzima catalase, transformando o peróxido de hidrogénio em oxigénio que provocam a formação de bolhas facilmente visíveis.

O teste de DNase com a adição de HCl demonstra se a bactéria tem capacidade de degradar o DNA do meio, sendo o caso de *S. aureus*.

A identificação de *S. aureus* ainda pode ser complementada com a utilização do meio agar-sangue que permite verificar que, aquando do crescimento desta bactéria, ocorre hemólise dos glóbulos vermelhos do meio.

### 3.4 ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS IDENTIFICADAS

Após o isolamento e identificação das seguintes bactérias *Enterococcus* spp., *E. coli* e *S. aureus*, através de meios seletivos e testes microbiológicos, procedeu-se ao seu armazenamento, utilizando-se meio de leite a 20%. Estes isolados foram cultivados em placas de Petri com BHI, numa estufa a 37°C, durante 24h. Após este período, todas as colónias foram recolhidas da placa com o auxílio da ansa e transferidas para os tubos de Eppendorf com meio de leite devidamente identificados. Por fim, os tubos de Eppendorf contendo os isolados, foram armazenados a -20°C para futuras análises genotípicas.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram processados utilizando o Excel no Microsoft Office 2019 e a análise estatística foi efetuada no programa IBM® SPSS Statistical® (versão 23).

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas foram calculados a média e o desvio padrão. As associações entre variáveis categóricas foram efetuadas pelo teste de Qui-quadrado e do teste exato de Fisher quando apropriado. As associações entre as variáveis numéricas com distribuição normal e as variáveis categóricas, foram efetuadas pelo teste de ANOVA. As associações entre as variáveis numéricas com distribuição não normal e as variáveis categóricas, foram efetuadas por testes não paramétricos, nomeadamente o Teste U de Mann-Whitney (quando existiam 2 grupos numa categoria) e o Teste de Kruskal-Wallis (quando existiam mais de 2 grupos numa categoria). Foi determinado, ainda, o coeficiente de correlação de Pearson para análise de duas variáveis contínuas. Todas as associações estatísticas com valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ENSAIO 1

#### 4.1.1 Caracterização da Amostra

Os resultados relativos aos dados recolhidos de 51 animais diferentes na Granja San José, em Espanha, estão representados na Tabela 2.

Através desta tabela, conseguimos perceber a grande homogeneidade que se observa nesta exploração, sendo que o método de conservação e de toma do colostro são sempre os mesmos (refrigerado e sonda esofágica, respetivamente), assim como a quantidade de colostro administrada a cada vitelo (4 litros).

O tempo entre o parto e a toma de colostro apresenta um valor médio de 122 minutos, ou seja, aproximadamente duas horas, sendo o valor mínimo 20 minutos e o valor máximo 300 minutos.

A correlação entre este parâmetro do tempo decorrido entre o parto e a toma de colostro e a proteína sérica do animal não é estatisticamente significativa.

Observamos um valor médio da qualidade imunológica do colostro de 24,66% Brix, bastante acima do *cut-off* de 22% Brix. Observa-se que 86,3% das amostras apresentam valores acima deste valor, ou seja, com boa qualidade imunológica.

A nível de proteína sérica, a exploração apresenta um valor médio de 8,38% Brix, valor muito próximo dos 8,4% Brix de *cut-off*. Desta forma, 49% dos vitelos observados apresentam valores de proteína sérica indicativos de sucesso na transferência de imunidade passiva.

Neste ensaio não se verifica uma correlação significativa ( $p=0,523$ ) entre a proteína sérica e a qualidade imunológica do colostro.

Tabela 2 - Dados Recolhidos na Exploração Espanhola (F - Fêmea, M - Macho, SA - Sem Ajuda, CAD - Com Ajuda Difícil, Past. - Pasteurização)

Nº Animal	Raça	Sexo	Facilidade Parto	Tamanho Vitelo	Método Conservação	Tempo Parto - Toma (min.)	Método Toma	Quantidade Colostro (L)	Pool Colostro	Qualidade (%Brix)	Past.	Proteína Sérica (%Brix)
9789	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	135	Sonda	4	8 T	23,60	Sim	9
9790	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	60	Sonda	4	8 T	23,60	Sim	8,6
9791	Holstein	F	SA	3	Refrigerado	45	Sonda	4	9 M	25,00	Sim	7,5
9792	Holstein	F	SA	1	Refrigerado	85	Sonda	4	10 M	25,40	Sim	6,9
9793	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	90	Sonda	4	8 M	18,50	Sim	8,5
9794	Holstein	F	SA	3	Refrigerado	20	Sonda	4	8 M	18,50	Sim	7,8
9795	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	160	Sonda	4	9M	25,00	Sim	9,7
1887	Angus	F	SA	1	Refrigerado	90	Sonda	4	9M	25,00	Sim	9
1888	Angus	F	SA	2	Refrigerado	100	Sonda	4	9M	25,00	Sim	8,4
9796	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	210	Sonda	4	9M	25,00	Sim	11,2
120	Angus	M	SA	2	Refrigerado	215	Sonda	4	9T	26,10	Sim	7
122	Angus	M	SA	2	Refrigerado	310	Sonda	4	9T	26,10	Sim	7,4
9797	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	80	Sonda	4	9T	26,10	Sim	8,8
1889	Angus	F	SA	1	Refrigerado	30	Sonda	4	9T	26,10	Sim	9
124	Angus	M	SA	2	Refrigerado	165	Sonda	4	11T	26,80	Sim	8,3
125	Angus	M	SA	2	Refrigerado	170	Sonda	4	11T	26,80	Sim	8,7
9798	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	175	Sonda	4	11T	26,80	Sim	9,6
126	Angus	M	SA	2	Refrigerado	180	Sonda	4	11T	26,80	Sim	6,2
9799	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	70	Sonda	4	10M	25,40	Sim	7,8
9800	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	150	Sonda	4	10M	25,40	Sim	8,2
128	Angus	M	SA	2	Refrigerado	20	Sonda	4	10M	25,40	Sim	7,6
9801	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	165	Sonda	4	10M	25,40	Sim	7,8
129	Angus	M	SA	2	Refrigerado	200	Sonda	4	12T	22,50	Sim	7,3

9802	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	205	Sonda	4	12T	22,50	Sim	8
9803	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	210	Sonda	4	10T	25,30	Sim	8,1
9804	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	215	Sonda	4	10T	25,30	Sim	7,9
131	Angus	M	SA	2	Refrigerado	120	Sonda	4	10T	25,30	Sim	7,5
9805	Holstein	F	SA	3	Refrigerado	130	Sonda	4	10T	25,30	Sim	8,9
133	Holstein	M	SA	2	Refrigerado	75	Sonda	4	12T	22,50	Sim	7,2
1890	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	70	Sonda	4	10T	25,30	Sim	9,1
9806	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	80	Sonda	4	10T	25,30	Sim	8,6
9809	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	160	Sonda	4	10T	25,30	Sim	9,1
9810	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	165	Sonda	4	10T	25,30	Sim	9,5
9811	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	170	Sonda	4	12T	22,50	Sim	7,8
9812	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	175	Sonda	4	10T	25,30	Sim	8,3
9813	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	60	Sonda	4	12M	24,80	Sim	8
9814	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	300	Sonda	4	12M	24,80	Sim	8,4
9815	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	70	Sonda	4	14M	21,30	Sim	8
9816	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	20	Sonda	4	14M	21,30	Sim	8,6
9817	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	200	Sonda	4	14M2	21,40	Sim	8,7
9818	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	30	Sonda	4	14M3	21,30	Sim	8
9819	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	40	Sonda	4	14T1	26,20	Sim	8,9
9820	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	45	Sonda	4	14T2	26,30	Sim	7,8
9821	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	50	Sonda	4	14T3	26,80	Sim	9
9822	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	55	Sonda	4	14M	21,30	Sim	7,7
9823	Holstein	F	CAD	1	Refrigerado	70	Sonda	4	14T	26,30	Sim	8,7
9824	Holstein	F	CAD	1	Refrigerado	75	Sonda	4	14T	26,30	Sim	8,7
9825	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	80	Sonda	4	14T	26,30	Sim	8,5
9826	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	70	Sonda	4	14T	26,30	Sim	7,5
9827	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	180	Sonda	4	15M	25,80	Sim	12
9828	Holstein	F	SA	2	Refrigerado	190	Sonda	4	15M	25,80	Sim	8,5

#### 4.1.2 Dados Recolhidos em Laboratório

Os resultados relativos às contagens totais de carga microbiana das amostras recolhidas em Espanha, quer antes da pasteurização, quer após a mesma, quer imediatamente antes da toma do vitelo, estão apresentados na seguinte Tabela 3.

Tabela 3 - Contagens Totais da Carga Microbiana da Exploração Espanhola (o símbolo “-” é relativo a amostras que acabaram por não ser administradas a nenhum vitelo)

Amostra	Pré-pasteurização	Pós-Pasteurização	Antes da Toma
8M	1560	40	-
8T	940	20	50
9M	820	20	330
9T	370	70	130
10M	680	210	120
10T	190	10	550
11T	1040	30	0
12M	1490	240	490
12T	750	0	280
13M	3440	20	-
14M1	110	0	18000
14M1	110	0	13400
14M2	110	0	12100
14T1	470	0	10
14T2	470	0	20
14T3	470	0	1280
15M	640	70	50

Através desta tabela, podemos verificar que o valor médio de contagem total de carga microbiana do colostro pré-pasteurizado é 961,5 UFC/mL, após a pasteurização é 56,2 UFC/mL e imediatamente antes da toma é 1819,1 UFC/mL.

Apesar de se observar uma diminuição da carga microbiana, em média, do colostro pré-pasteurizado para o pós-pasteurizado e um aumento do pós-pasteurizado para o que é administrado ao vitelo, não existe uma correlação significativa entre os 3 parâmetros.

Realizando uma comparação da contagem total da carga microbiana com a proteína sérica de cada vitelo, não se observa também qualquer correlação significativa ( $p=0,171$ ).

## 4.2 ENSAIO 2

### 4.2.1 Caracterização da Amostra

Os resultados relativos aos dados recolhidos de 37 animais diferentes, distribuídos por 13 explorações leiteiras na bacia leiteira de Vila do Conde, Póvoa de Varzim e Maia, estão representados na Tabela 4. Das 37 amostras de colostro, 5 são referentes a colostro pasteurizado.

Das 13 explorações incluídas no estudo, foram utilizados, em média, 2,85 vitelos de cada uma, sendo 56,8% deles fêmeas e 43,2% machos.

Relativamente à facilidade de parto, nenhuma vaca foi sujeita a cesariana, mas verificaram-se 2 partos em que se recorreu a ajuda difícil para extração do vitelo, 8 com ajuda fácil e 27 que não necessitaram de qualquer auxílio.

No que concerne ao método de conservação do colostro, somente um deles foi congelado, 6 refrigerados e os restantes 30 eram frescos, ou seja, da própria mãe do vitelo.

De todos os vitelos observados, verificou-se que 51,4% deles foram alimentados por biberão, 32,4% por sonda esofágica e 16,2% por balde e o tempo médio decorrido desde o parto até à toma de colostro foi de 241 minutos.

Tabela 4 - Dados Recolhidos nas Explorações Portuguesas (Expl. - Exploração, F - Fêmea, M - Macho, SA - Sem Ajuda, CAF - Com Ajuda Fácil, CAD - Com Ajuda Difícil, Past. - Pasteurização. O símbolo “-” é relativo a amostras congeladas e refrigeradas em que não se aplica o fator “Tempo Parto-Ordenha”)

Nº Amostra	Expl. Sexo	Facilidade Parto	Tamanho Vitelo	Método Conservação	Tempo Parto - Ordenha (min.)	Tempo Parto - Toma (min.)	Método Toma	Quantidade Colostro (L)	Qualidade de (%Brix)	Past.	Proteína Sérica (%Brix)
1	A M	CAF	2	Refrigerado	-	60,00	Biberão	3,5	25,60	Não	9,10
5	B F	SA	1	Congelado	-	90,00	Sonda	4	24,80	Sim	8,40
6	B F	SA	2	Fresco	15,00	120,00	Sonda	4	25,30	Não	6,80
7	A F	SA	2	Refrigerado	-	120,00	Biberão	4	24,20	Não	6,70
8	C F	SA	2	Fresco	180,00	195,00	Sonda	4	21,80	Não	7,40
9	D F	CAF	2	Fresco	630,00	720,00	Biberão	4	14,80	Não	6,10
10	E F	SA	2	Fresco	270,00	285,00	Biberão	4	14,50	Não	7,50
11	F M	CAD	1	Fresco	570,00	585,00	Biberão	3,5	21,10	Não	7,70
12	G M	SA	2	Fresco	120,00	135,00	Biberão	3,5	21,90	Não	9,40
13	G F	SA	2	Fresco	570,00	585,00	Biberão	3,5	23,80	Não	7,30
14	E F	SA	2	Fresco	450,00	480,00	Biberão	4	17,80	Não	8,50
15	H F	SA	2	Fresco	120,00	135,00	Balde	3	17,80	Não	8,10
16	I F	SA	2	Fresco	330,00	360,00	Sonda	3,5	14,90	Não	7,10
17	E M	CAF	2	Fresco	180,00	195,00	Biberão	3,5	24,10	Não	10,00
18	A F	SA	2	Refrigerado	-	90,00	Biberão	4	20,90	Não	8,00

19	B	F	SA	2	Fresco	15,00	120,00	Sonda	4	25,30	Sim	6,80
20	F	F	CAF	2	Fresco	180,00	195,00	Sonda	4,5	20,70	Não	7,30
21	I	M	SA	2	Fresco	90,00	120,00	Sonda	4	27,20	Não	8,70
22	F	F	SA	2	Fresco	450,00	480,00	Biberão	4	16,10	Não	7,40
23	J	M	SA	2	Fresco	180,00	195,00	Balde	2	24,00	Não	6,80
24	J	F	CAF	2	Fresco	10,00	25,00	Balde	2,5	25,00	Não	8,70
25	J	M	SA	2	Fresco	300,00	310,00	Balde	2	21,00	Não	9,70
26	L	M	SA	2	Fresco	225,00	240,00	Sonda	3	22,40	Não	7,10
27	L	M	SA	1	Fresco	300,00	315,00	Sonda	2,5	21,50	Não	6,60
28	L	M	SA	2	Fresco	105,00	120,00	Sonda	3	18,80	Não	7,20
29	C	F	SA	2	Fresco	150,00	165,00	Sonda	4	18,50	Não	7,40
30	C	F	SA	2	Fresco	90,00	105,00	Sonda	4	19,20	Não	7,40
31	D	M	SA	2	Fresco	225,00	240,00	Biberão	4	23,00	Não	9,40
32	M	M	CAF	2	Fresco	60,00	75,00	Biberão	2	17,90	Não	7,20
33	M	M	CAF	2	Fresco	510,00	525,00	Biberão	2	26,20	Não	8,30
34	M	F	SA	2	Fresco	240,00	255,00	Biberão	2,5	20,60	Não	7,90
35	H	M	CAD	2	Fresco	135,00	145,00	Balde	2,5	24,80	Não	8,50
36	H	M	CAF	2	Fresco	120,00	140,00	Balde	3,5	22,70	Não	8,40
37	N	F	SA	2	Refrigerado	-	210,00	Biberão	3,5	27,50	Sim	9,50
38	N	F	SA	3	Refrigerado	-	360,00	Biberão	3	27,40	Sim	8,50
39	N	F	SA	2	Refrigerado	-	240,00	Biberão	4	21,60	Sim	9,30
40	D	M	SA	2	Fresco	165,00	180,00	Biberão	4	21,50	Não	9,80

Comparando o sexo do vitelo com a facilidade de parto, apesar de a significância ser de 0,086, observamos que, havendo um menor número de machos do que fêmeas, são os vitelos do sexo masculino a apresentarem mais casos em que foi necessária alguma ajuda e os únicos em que foi necessário o uso de um aparelho de extração de vitelos, como demonstra o Gráfico 1.

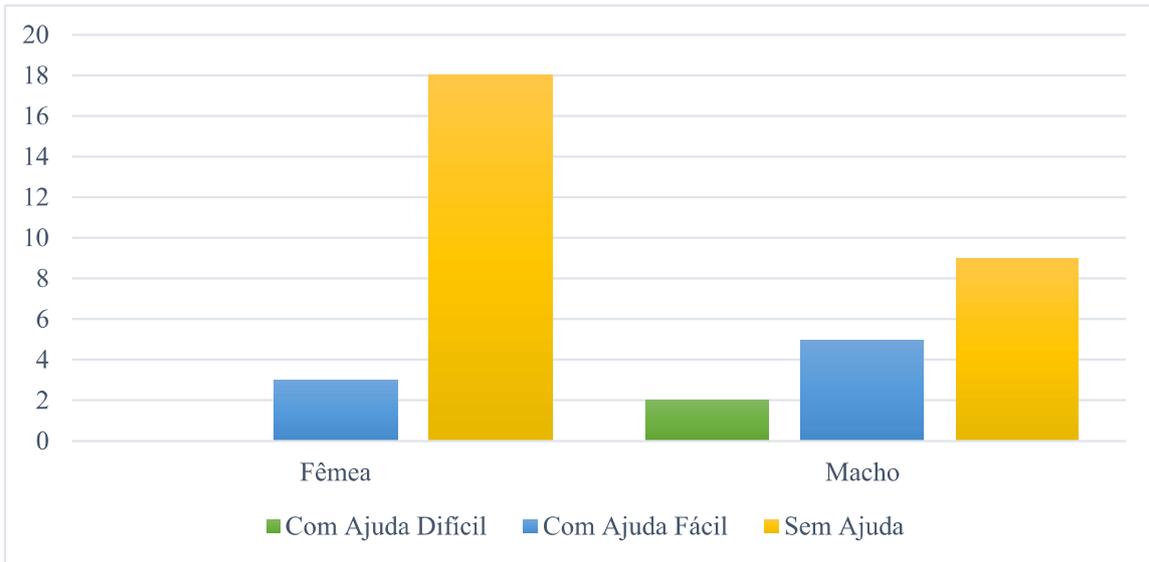


Figura 9 - Relação entre a Facilidade de Parto e o Sexo do Vitelo nas Explorações Portuguesas

A quantidade de colostro varia significativamente ( $p=0,004$ ) com a exploração, como demonstrado no Gráfico 2.

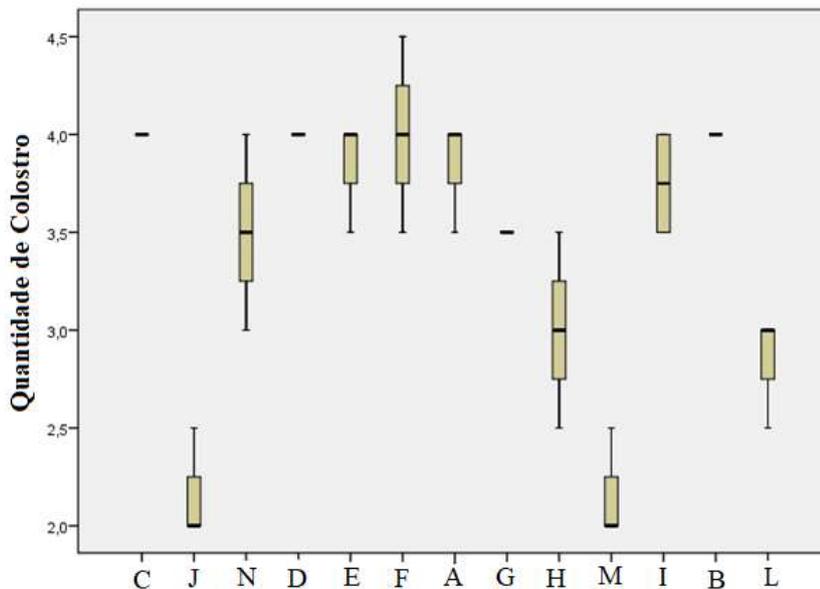


Figura 10 - Relação entre a Quantidade de Colostro (em litros) Administrada e a Exploração

Verifica-se uma correlação muito significativa ( $p=0,004$ ) entre a quantidade de colostro administrada ao vitelo e o sexo do animal, administrando-se maiores volumes a fêmeas do que a machos, como se observa no Gráfico 3.

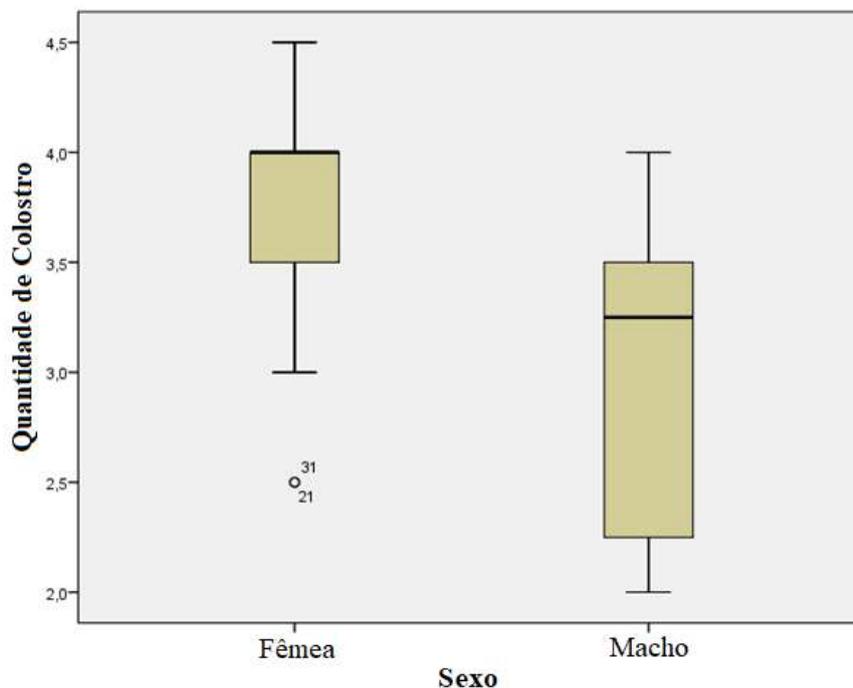


Figura 11 - Relação entre o Sexo do Vitelo e a Quantidade de Colostro (em litros) Administrada nas Explorações Portuguesas

A qualidade imunológica das amostras de colostro recolhidas apresenta um valor médio de 21,7892%, que é um valor que se encontra abaixo do *cut-off* (22%) referido na bibliografia. O valor máximo registado foi 27,50% e o valor mínimo foi 14,50%.

Relacionando a qualidade imunológica de colostro com as explorações, verifica-se que 76,9% das explorações tanto apresentam colostros de elevada qualidade imunológica, como baixa, sendo a correlação entre ambos os fatores pouco significativa ( $p=0,487$ ).

No que diz respeito ao método de conservação e apesar de não haver uma correlação significativa, 100% do colostro congelado e 66,7% do colostro refrigerado (colostros armazenados) apresentam níveis elevados de imunoglobulinas, enquanto somente 40% dos colostros frescos apresentam tais valores, como se pode constatar no Gráfico 4.

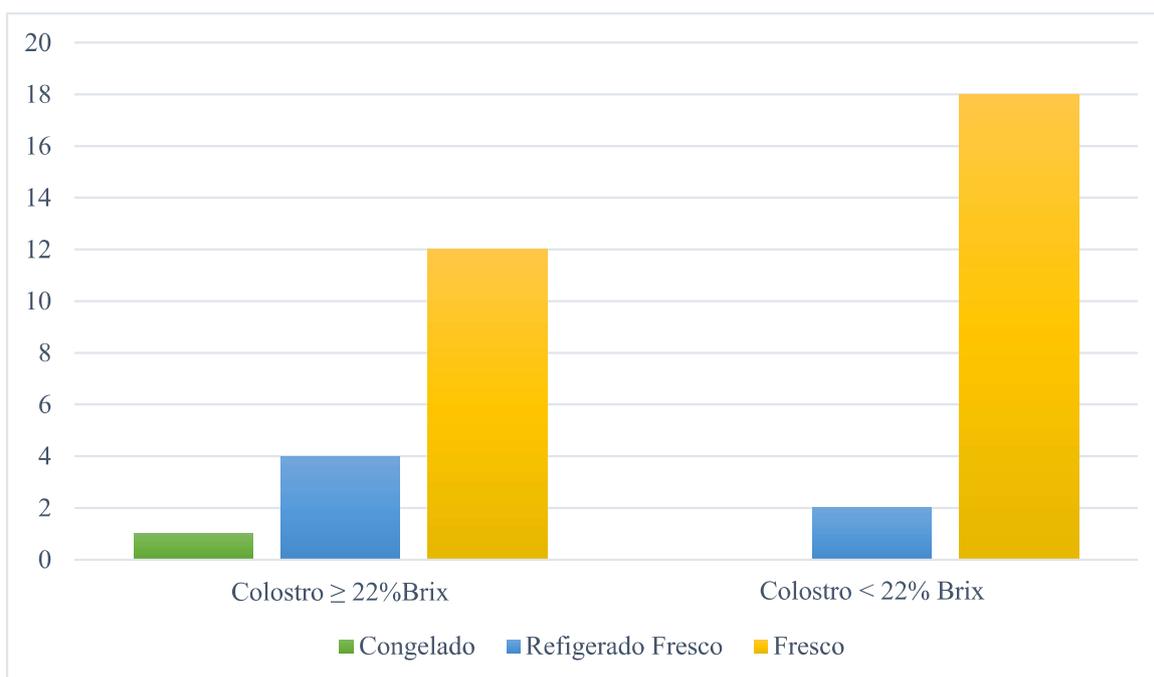


Figura 12 - Relação entre a Qualidade Microbiológica do Colostro e o seu Método de Conservação nas Explorações Portuguesas

Verifica-se uma correlação altamente significativa ( $p=0,016$ ) entre a qualidade imunológica do colostro e a pasteurização, sendo que, das 5 amostras de colostro pasteurizado, 4 apresentam valores bastante superiores a 22% e uma apresenta um teor ligeiramente inferior a este *cut-off*. A média dos colostros pasteurizados corresponde a 25,32%, enquanto a dos não pasteurizados corresponde a 21,24%.

Apesar de se verificar uma tendência em fornecer uma maior quantidade de colostro às fêmeas, a qualidade imunológica não parece acompanhar o mesmo sentido, verificando-se até uma média de concentração de imunoglobulinas no colostro administrado aos machos (22,7313%) superior àquele oferecido às fêmeas (21,0714%) ( $p=0,222$ ), como se pode observar no Gráfico 5.

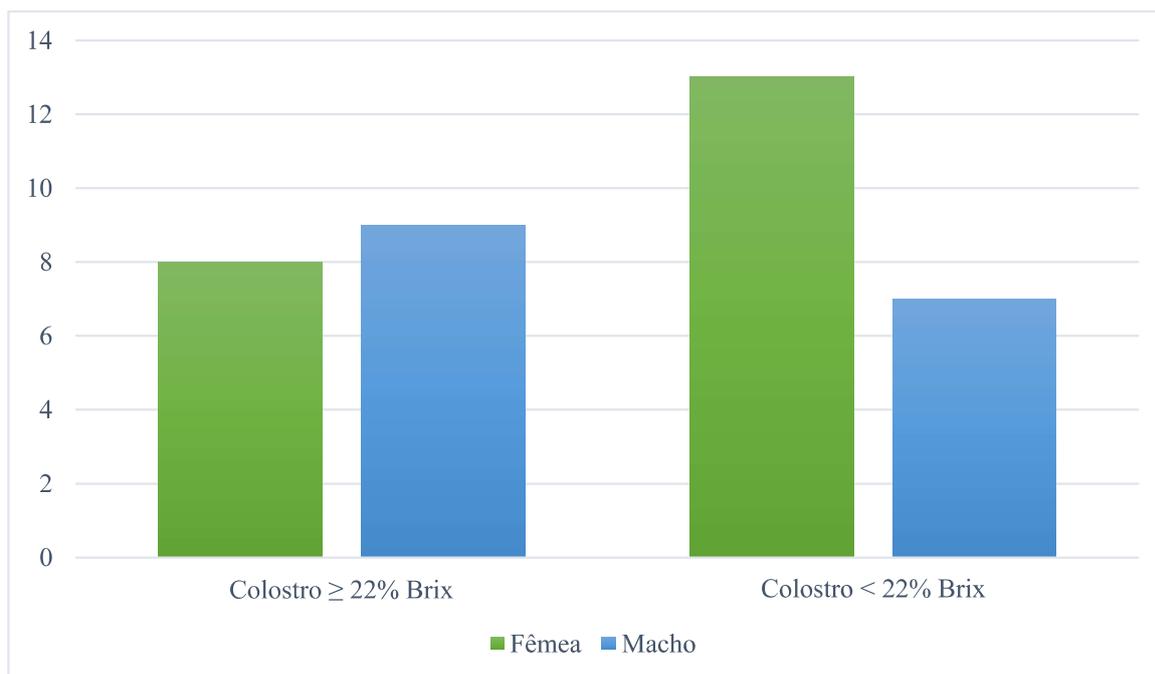


Figura 13 - Relação entre a Qualidade Imunológica do Colostro e o Sexo do Vitelo nas Explorações Portuguesas

Das 5 amostras pasteurizadas, 4 delas foram armazenadas e somente uma foi administrada imediatamente após a pasteurização.

Considerando um *cut-off* de 8,4% Brix (5,5g/dL) de proteína sérica, observa-se que 40,5% dos animais apresentam níveis superiores a esse valor e 59,5% abaixo do mesmo, como demonstrado na tabela 4.

Realizando uma comparação da proteína sérica com as explorações, não se verifica relação, sendo que 61,5% das explorações tanto apresentam vitelos com altos níveis de proteína sérica, como baixos.

Relativamente ao sexo do vitelo, apesar de não apresentar  $p < 0,05$ , verifica-se que 56,25% dos machos apresentam elevados níveis de proteína sérica, enquanto só 28,57% das fêmeas apresentam tais níveis.

No que concerne ao método de conservação, 100% dos vitelos que foram encalostrados com colostro congelado apresentam níveis de proteína sérica superiores a 8,4%, enquanto tais níveis só se verificaram em 66,7% dos vitelos alimentados com colostro refrigerado e em 50% dos vitelos que ingeriram colostro fresco.

Não se verifica uma correlação significativa entre o tempo decorrido entre o parto e a toma de colostro e a proteína sérica ( $p=0,627$ ), nem entre esta última e a quantidade de colostro administrada ( $p=0,743$ ).

Já no que diz respeito à relação entre a qualidade imunológica do colostro e a proteína sérica do vitelo, verifica-se uma correlação significativa ( $p=0,039$ ), sendo que 58,8% dos vitelos que ingeriram colostro com qualidade imunológica superior a 22%, apresentaram altos níveis de proteína sérica, enquanto 75% dos animais que foram alimentados com colostro de menor qualidade imunológica apresentaram baixos teores de proteína sérica, como demonstrado pelo Gráfico 6.

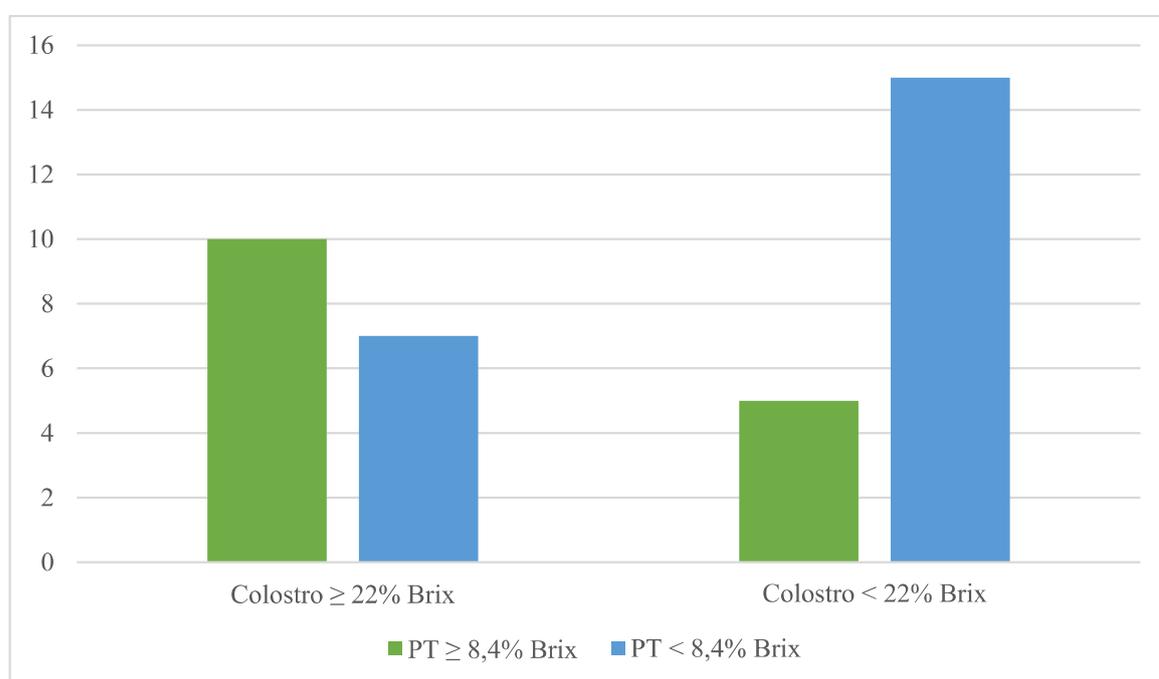


Figura 14 - Relação entre a Qualidade Imunológica do Colostro e a Proteína Sérica do Vitelo nas Explorações Portuguesas

#### 4.2.2 Dados Recolhidos em Laboratório

No que diz respeito aos resultados obtidos na análise microbiana, observou-se que 83,8% de amostras analisadas apresentaram baixa contagem bacteriana total e, consequentemente, 16,2% de amostras estavam altamente contaminadas (Tabela 5), considerando um *cut-off* de 100.000 UFC/mL como indicativo de contaminação microbiológica de colostro.

Tabela 5 - Dados relativos à Contaminação Microbiológica de Coloostro das Explorações Portuguesas

Nº Amostra	Contagem Bacteriana Total (UFC/mL)	Presença de <i>S. aureus</i>	Presença de <i>Enterococcus</i> spp.	Presença de <i>E. coli</i>
1	37200	Sim	Não	Não
5	110	Não	Sim	Não
6	420	Não	Sim	Não
7	33600000	Sim	Sim	Sim
8	2000	Sim	Não	Não
9	720000	Não	Sim	Não
10	5000	Não	Sim	Não
11	30000	Não	Sim	Não
12	5700	Não	Sim	Não
13	7700	Não	Sim	Não
14	7200	Não	Sim	Não
15	1100	Não	Sim	Não
16	64000	Não	Sim	Não
17	12000	Não	Não	Não
18	1870000000	Não	Sim	Sim
19	2000	Não	Não	Não
20	720	Não	Não	Não
21	134000	Não	Sim	Não
22	2300	Não	Sim	Não
23	2100	Não	Não	Não
24	510	Não	Não	Não
25	3000	Não	Sim	Não
26	1800	Não	Sim	Não
27	740	Não	Sim	Não
28	1800	Não	Sim	Não
29	72000	Não	Sim	Sim
30	1920	Não	Sim	Não
31	11000	Não	Sim	Não
32	35000	Não	Sim	Não
33	380	Não	Não	Não
34	620	Não	Sim	Não
35	1630000	Não	Sim	Não
36	18600	Não	Sim	Sim
37	910	Não	Sim	Não
38	920	Não	Sim	Não
39	3100	Não	Sim	Não
40	392000	Não	Sim	Sim

Dentro dos 3 agentes patogênicos pesquisados nas amostras de colostro, foram encontradas, 78,4% de *Enterococcus* spp. (Figura 9), 13,5% de *Escherichia coli* (Figuras 10 e 11), e 8,1% de amostras com *Staphylococcus aureus* (Figura 12); sendo que 83,8% das amostras apresentam crescimento de, pelo menos, um destes agentes patogênicos.

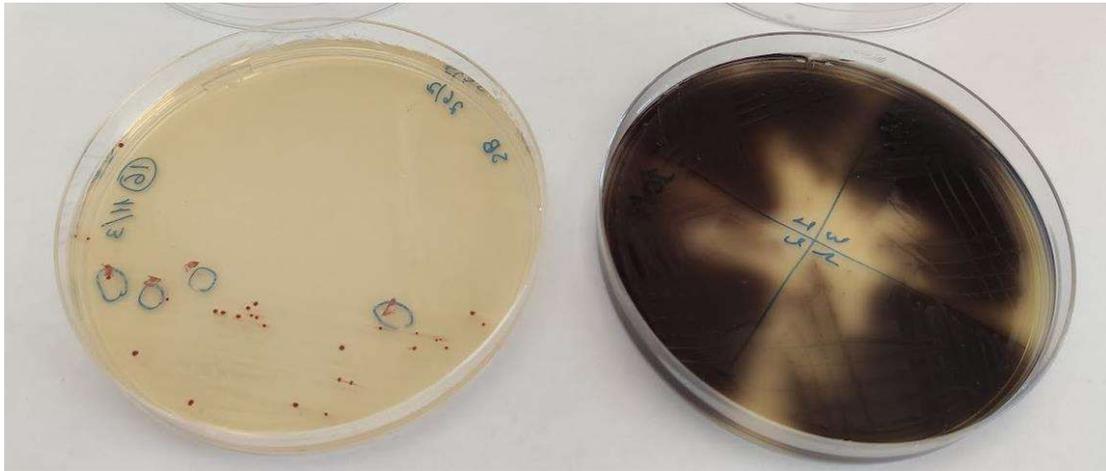


Figura 15 - Meios de Cultura com Crescimento Bacteriano compatível com *Enterococcus* spp. (da esquerda para a direita: Slanetz and Bartley com crescimento e Esculina com crescimento)  
Fonte: Própria

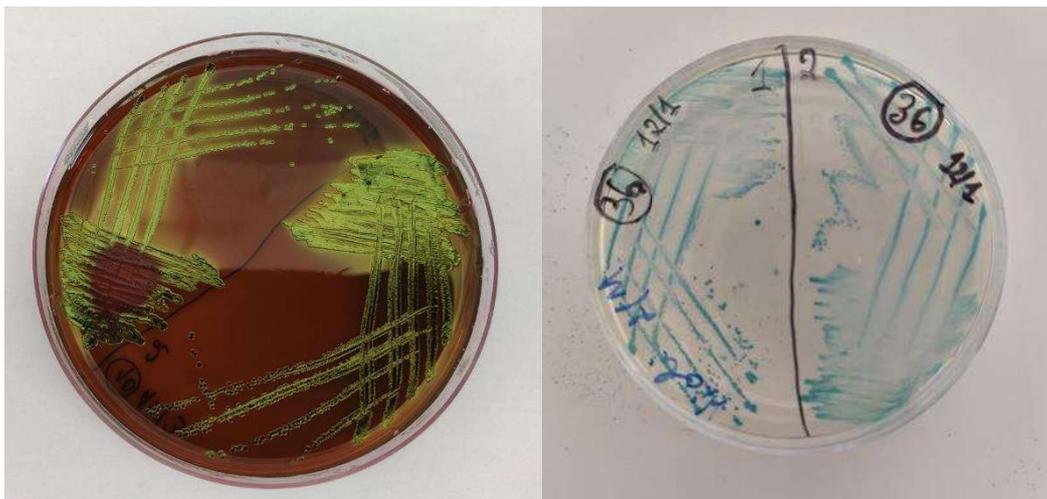


Figura 16 - Meios de Cultura com Crescimento Bacteriano compatível com *E. coli* (da esquerda para a direita: Levine com crescimento e HiCrome™ com crescimento)  
Fonte: Própria

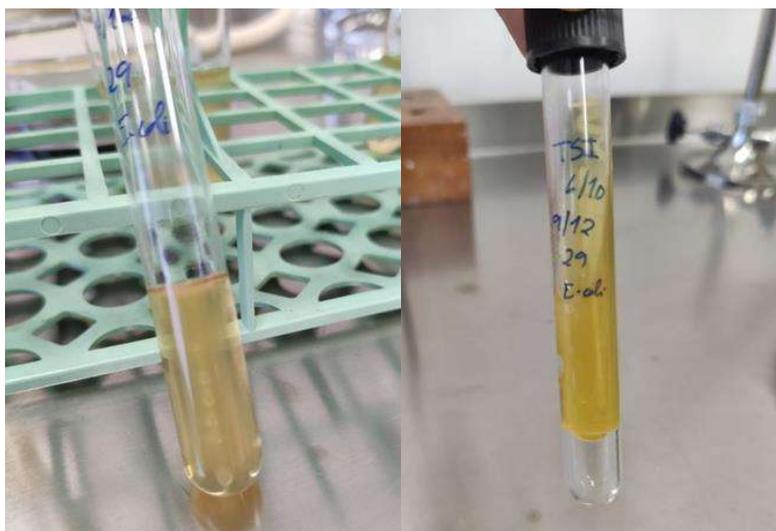


Figura 17 – Provas complementares para confirmação de presença de *E. coli* (da esquerda para a direita: teste SIM positivo ao teste Indol e teste TSI positivo à fermentação de 3 açúcares, ambos compatíveis com *E. coli* (Fonte: Própria)

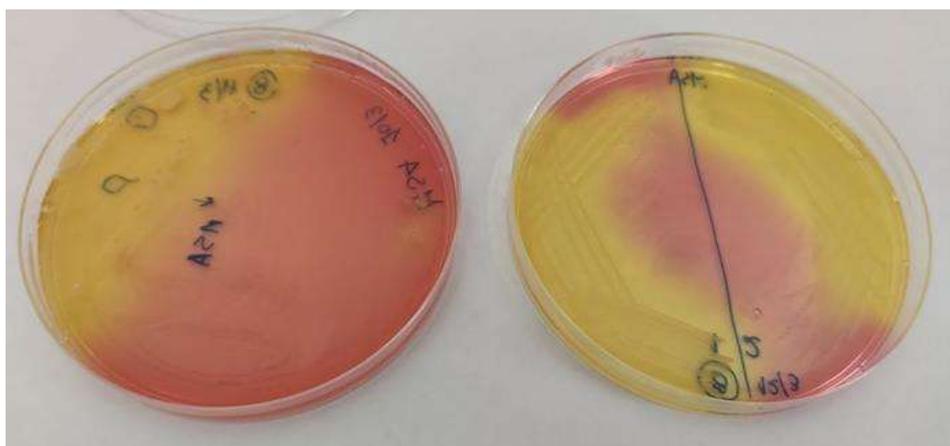


Figura 18 - Meio de MSA com crescimento compatível com *S. aureus* (Fonte: Própria)

Não se verifica uma probabilidade de significância inferior a 0,05 no que concerne à associação entre a exploração e a contagem total bacteriana ( $p=0,099$ ), apesar de, das 6 amostras altamente contaminadas, 4 dessas serem pertencentes a somente 2 explorações.

No que diz respeito à relação entre o método de conservação do colostro e a contagem total bacteriana, esta parece não existir, apesar de 1/3 das amostras refrigeradas (duas em seis), apresentarem contaminação, em comparação com 13% das amostras frescas e 0% das amostras congeladas.

Observa-se uma distribuição muito semelhante de amostras contaminadas consoante o método de administração do colostro ao vitelo, quer seja balde, biberão ou sonda;

Apesar de nenhuma das amostras de colostro pasteurizado apresentar altos níveis de contaminação e 18,7% das amostras não pasteurizadas terem elevadas contagens bacterianas totais, não aparenta haver correlação entre os dois fatores (a pasteurização e a contaminação).

De entre os 3 agentes patogénicos pesquisados, somente a *E. coli* apresenta probabilidade de significância inferior a 0,05 relativamente ao grau de contaminação da amostra, visto que 3 das 5 amostras contaminadas com este agente patogénico apresentam contagens totais de carga microbiana elevadas.

No que concerne à existência dos agentes patogénicos pesquisados em amostras de colostro pasteurizado, verificou-se a inexistência de crescimento quer de *S. aureus* quer de *E. coli*. Contudo, verificou-se a ocorrência de crescimento de *Enterococcus* spp. em 80% das amostras de colostro pasteurizado.

Relacionando a proteína sérica com a contagem total da carga bacteriana, não se observa uma correlação significativa entre ambos os fatores ( $p=0,666$ ), como demonstra o Gráfico 7, nem entre a proteína sérica e o crescimento de qualquer um dos agentes patogénicos pesquisados.

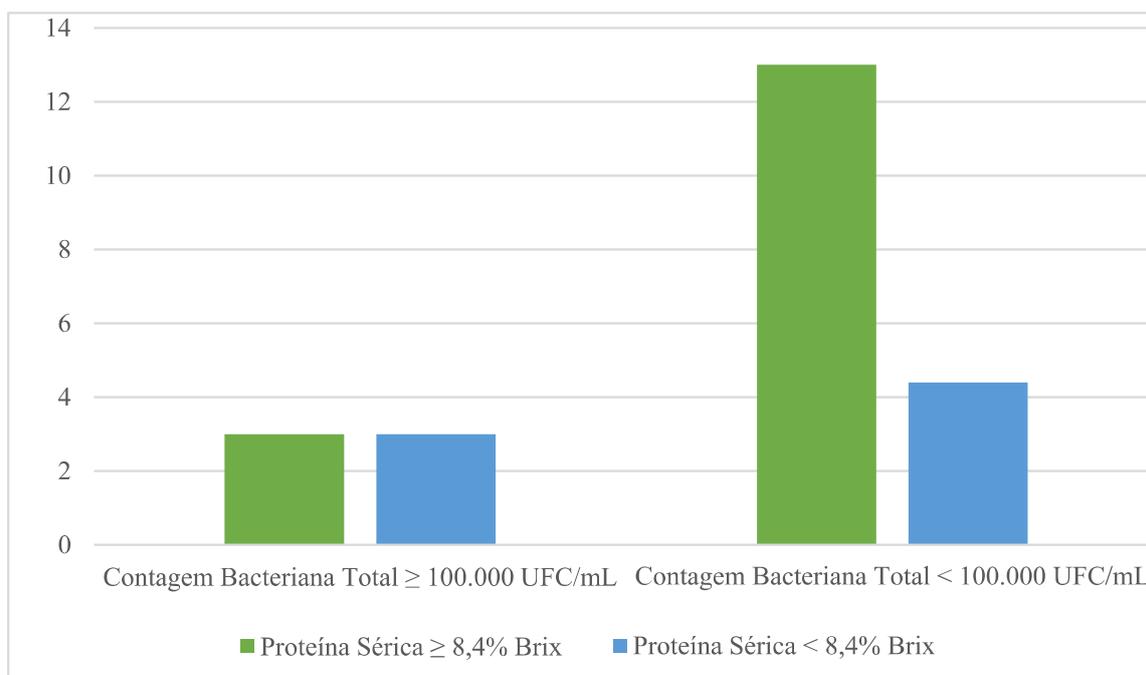


Figura 19 - Relação entre a Contaminação Microbiológica do Colostro e a Proteína Sérica do Vitelo nas Explorações Portuguesas

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, relativamente ao ensaio 2, realizado em Portugal, o facto de se verificar um maior número de partos distócicos no caso de vitelos machos vai de encontro à bibliografia existente, como reporta Norman *et al.* (2010), num estudo em que se observa 6,0% de partos distócicos em novilhas inseminadas com sémen convencional e 4,3% no caso de sémen sexado, enquanto nas vacas se verificou uma incidência de 2,5% de partos distócicos para sémen convencional e 0,9% para sémen sexado.

Relativamente à quantidade de colostro administrada aos vitelos, observamos uma grande variação de quantidades administradas a cada animal entre as várias explorações (desde 2L até 4,5L). Isto deve-se a grandes diferenças no maneio dos animais entre cada exploração e, visto que grande parte do colostro administrado neste estudo é fresco, a quantidade administrada ao vitelo está diretamente relacionada à quantidade de colostro que a sua mãe produz, não existindo qualquer banco de colostro ou substituto do mesmo em grande parte das explorações analisadas, pelo que, se a vaca produzir 2L de colostro, será somente essa a quantidade que o seu filho irá tomar.

Comparando o sexo do vitelo com a quantidade de colostro administrada, observamos uma grande discrepância, tendo os produtores de leite tendência em fornecer maior quantidade de colostro às fêmeas do que aos machos. Esta constatação vai de encontro ao que Shivley *et al.* (2019) e Renaud *et al.* (2020) observaram nos seus estudos realizados ambos nos Estados Unidos da América e, na opinião do autor, deve-se ao facto de os vitelos machos apresentarem um menor valor de mercado e de não acrescentarem grande interesse ao futuro das explorações leiteiras portuguesas, que dependem cada vez mais de sémenes importados e menos de machos que cresçam na exploração e sirvam de reprodutor.

No que concerne à qualidade imunológica do colostro, tendo em conta a escala de Brix, um estudo de Kessler *et al.* (2021) apresentou uma média de 22,1% Brix de concentração de PT em colostro de 108 vacas e um outro de Phipps *et al.* (2017), na Austrália, apresentou uma média de 20,1% Brix, em 442 vacas, sendo que 38,9% das amostras apresentavam valores iguais ou superiores a 22% Brix, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. Contudo, não deixam de ser valores preocupantes por se estar a fornecer uma quantidade tão grande de colostro de baixo valor imunológico. Isto também se verifica devido ao facto de, tendo em conta o tamanho médio das explorações leiteiras do estudo, somente duas realizarem bancos de colostros ou medirem, através de um refratómetro, a qualidade dos seus colostros,

administrando-os aos seus animais sem conhecimento prévio dessa mesma qualidade. Já no caso do ensaio 1, apesar de se realizarem *pools* de colostro que poderiam provocar uma diluição dos colostros de melhor qualidade, a média de concentração de IgG's é bastante elevada (24,66% Brix).

Quanto ao método de conservação do colostro, a aparente melhor qualidade imunológica dos colostros armazenados, congelado e refrigerados, deve-se ao facto de as explorações onde se procedeu a esse armazenamento realizarem um banco de colostro e medição de imunoglobulinas por refratómetro ótico, tendo o cuidado de armazenar colostro com a melhor qualidade imunológica possível.

No que diz respeito à elevada qualidade imunológica dos colostros pasteurizados, a justificação é exatamente a mesma do parâmetro anterior, ou seja, as explorações do estudo que realizam pasteurização de colostro, precedem-na de uma medição de IgG's através de um refratómetro ótico.

Apesar de não ser significativo ( $p=0,222$ ), verificou-se que as fêmeas ingeriram, em média, colostro com menor qualidade imunológica (21,1%) do que os machos (22,7%), o que poderá estar relacionado com o facto de, quanto maior a produção de colostro por parte da vaca, menor a sua concentração em IgG's, como comprovado pelos estudos de Baumrucker *et al.* (2010) e Sutter *et al.* (2019), devido ao efeito de diluição da água. Como se verificou uma maior quantidade de colostro administrada às fêmeas no estudo, é expectável que esse colostro esteja mais diluído e, conseqüentemente, apresente menores valores de concentração de imunoglobulinas.

Abordando a qualidade microbiológica dos colostros analisados neste estudo, observa-se uma incidência de 16,2% de amostras contaminadas ( $>100.000\text{UFC/mL}$ ), o que demonstra alguma discórdia relativamente à bibliografia existente. Um estudo de Mellado *et al.* (2017) no norte do México, num ambiente com temperaturas elevadas, demonstrou uma incidência de 41,3% de colostros contaminados, num total de 300 amostras. Um outro estudo, no Québec, Canadá, realizado por Morin *et al.* (2021), apresentou uma incidência de 50% de amostras de colostro contaminadas, num total de 332 amostras. Num outro estudo, também no Québec, Canadá, de Fecteau *et al.* (2002), verificou-se uma incidência de 35,9% de amostras contaminadas, num trabalho que envolveu 234 animais. Já um outro trabalho mais recente, realizado na Europa, mais especificamente na República Checa, por Šlosárková *et al.* (2021), verificou uma incidência de 71,6% de amostras contaminadas, num total de 155. Relativamente

à realidade espanhola, não se verifica contaminação em nenhuma das 51 amostras recolhidas (nem antes da pasteurização nem depois da mesma), nem nenhum valor que se aproxime sequer das 100.000 UFC/mL, o que se deve em grande parte ao excelente manejo e instalações ali observados. Deste modo, o nosso estudo aparenta melhores resultados a nível de contaminação microbiológica do colostro comparativamente com a bibliografia existente, apesar de a amostragem ser muito menor.

Quanto aos agentes patogénicos pesquisados no colostro, as incidências que observamos no nosso trabalho foram de 8,1% para *S. aureus*, 13,5% para *E. coli* e 78,4% para *Enterococcus* spp., sendo que a bibliografia referente a este aspeto é muito escassa. Contudo Fecteau *et al.* (2002) realizou uma pesquisa extensa de agentes patogénicos, dividindo-os até em 4 grupos (agentes patogénicos da pele e mucosa, contaminantes ambientais, contaminantes fecais e agentes patogénicos da glândula mamária), onde observou uma incidência de 7,3% de *S. aureus*, 3,8% de *E. coli* e 22,2% de *Enterococcus* spp.. Um outro estudo mais direcionado para pesquisa de *E. coli*, por Mohammed *et al.* (2019), no Egito, verificou uma incidência de 12,1% deste mesmo agente num total de 33 amostras de colostro. Quanto ao estudo já referido anteriormente realizado na República Checa, por Šlosárková *et al.* (2021), observou-se uma incidência de 3,2% de *S. aureus*, 9,0% de *E. coli* e 73,5% de *Enterococcus* spp.. De salientar que, neste último trabalho, as amostras de colostro foram recolhidas do balde da colheita de colostro na ordenha, sendo que o valor real da incidência dos agentes patogénicos, principalmente dos contaminantes fecais, ao momento da administração do colostro ao vitelo, será previsivelmente mais elevado. Deste modo, os valores observados no nosso estudo parecem ir de encontro à escassa bibliografia existente, com especial atenção para a elevada incidência de *Enterococcus* spp..

Apesar de serem estudos com um número muito maior de agentes patogénicos pesquisados, Fecteau *et al.* (2002) registaram o crescimento de pelo menos um agente patogénico em 94,4% das amostras e Šlosárková *et al.* (2021) observaram em 98,1% das suas amostras, o que, comparado com a incidência de 83,8% no nosso estudo, se pode justificar por somente termos pesquisado 3 agentes patogénicos.

Relativamente aos métodos de conservação, observamos no nosso estudo uma percentagem de contaminação mais elevada nos colostros refrigerados, nomeadamente naqueles colhidos há pelo menos 3 dias, o que vai de encontro ao trabalho realizado por Stewart *et al.* (2005), que verificaram um aumento da carga total bacteriana em amostras de colostro

refrigerado sem qualquer tipo de conservante, a partir do terceiro dia após colheita. O facto de, ao armazenarmos o colostro, lhe estarmos a adicionar mais um meio de contaminação (seja um saco, uma garrafa, uma luva de inseminação, entre outros) ao processo entre a ordenha e a administração, relativamente ao colostro fresco, é um outro motivo para promover um aumento da contagem total bacteriana.

Assim como demonstram os trabalhos de Besser *et al.* (1991), Stewart *et al.* (2005) e Chigerwe *et al.* (2012), não se verifica uma relação significativa entre o método de administração do colostro e a sua contaminação.

Toda a bibliografia referente ao tratamento de colostro com altas temperaturas, como são os estudos de Johnson *et al.* (2007), Elizondo-Salazar *et al.* (2010) e Donahue *et al.* (2012), descreve uma redução significativa da contagem total bacteriana. O nosso estudo, apesar de não apresentar qualquer amostra de colostro pasteurizado com contaminação, não apresenta uma correlação significativa entre o tratamento do colostro a altas temperaturas e a contagem total bacteriana, podendo ser este facto justificado pelo baixo número de amostras total e de colostro pasteurizado, assim como a baixa incidência de contaminação em colostros não pasteurizados.

Apesar da eficácia comprovada na redução e, em alguns casos, na extinção da carga microbiana de alguns agentes patogénicos, Trujillo *et al.* (2007) demonstrou que, em colostro caprino, a pasteurização a 63°C, apesar de reduzir significativamente a carga microbiana de *Enterococcus spp.*, não a elimina por completo, o que corrobora a presença deste agente nas amostras pasteurizadas do estudo. Um outro motivo para o sucedido é o facto de as amostras serem recolhidos somente aquando da administração do colostro e, entre o momento da pasteurização e da toma, outros fatores (como a higiene dos meios usados na administração) podem causar a contaminação do colostro.

No que concerne aos níveis de proteína sérica dos vitelos avaliados, um estudo realizado em Guimarães por Dias (2016), apresentou valores de FTP na ordem dos 70%. Nos Estados Unidos da América, um estudo demonstrou uma incidência de FTP de 19,2% em 1.816 vitelos de 17 estados daquele país (Beam *et al.*, 2009). Já em Ontario, no Canadá observou-se uma incidência de FTP de 37% em 407 animais num trabalho de Trotz-Williams *et al.* (2008) e, mais recentemente, um outro estudo demonstrou insucesso na transferência de imunidade em 24% de 386 vitelos (Renaud *et al.*, 2020). Na Austrália, um estudo recente demonstrou FTP em somente 8,7% de 495 animais (Aleri *et al.*, 2021). No que concerne ao nosso estudo, verificamos na região Entre Douro e Minho uma taxa de FTP de 59,5% e na Catalunha de 51%,

valores bastante superiores ao que a bibliografia referente a outros países nos indica, sendo que os nossos valores, apesar de elevados, são ainda inferiores ao outro estudo realizado por Dias (2016), em Guimarães. De salientar que alguns dos estudos referidos, nomeadamente os canadianos, se regem por um *cut-off* de 5,2g de PT por 1dL de sangue.

Vários estudos nos Estados Unidos da América (Johnson *et al.*, 2007; Elizondo-Salazar & Heinrichs, 2009; Godden *et al.*, 2012;) e um na Irlanda (Cummins *et al.*, 2017) comparam amostras de colostro não pasteurizado (com contagens totais de carga microbiana mais elevadas) com amostras de colostro pasteurizado (com contagens totais de carga microbiana mais baixas) e correlacionam com os níveis de proteínas totais dos vitelos observados. Todos estes estudos apresentam correlações significativas entre ambos os fatores (pasteurização e proteína sérica), dos quais se extrapola uma correlação entre a contaminação do colostro e a absorção de IgG's por parte do vitelo, algo que não se verifica no nosso estudo.

Godden *et al.* (2012, 2019) demonstraram que a influência da contaminação do colostro por coliformes na absorção de IgG's pelo vitelo é maior do que a da contagem total de carga microbiana, o que também não se verifica no nosso estudo, pois não há nenhuma correlação entre a presença de *E. coli* nas amostras de colostro e as PT do animal.

Um estudo de Aleri *et al.* (2021) apresentou uma prevalência ligeiramente maior de FTP nos machos relativamente às fêmeas, o que contradiz os nossos resultados, apesar de em nenhum dos casos a correlação ser estatisticamente significativa.

Relativamente à correlação do método de conservação com os níveis de proteína sérica, verifica-se que as amostras de colostro que foi previamente armazenado (refrigerado ou congelado) apresenta valores mais elevados de concentração de IgG's relativamente aos colostros frescos, o que pode justificar os maiores níveis de proteína sérica dos animais que lhes estão associados.

Neste estudo não se observou nenhuma correlação significativa entre a quantidade de colostro e os níveis de proteína sérica, nem entre este último e o tempo decorrido entre o parto e a toma. Estes valores contrastam com os estudos de Jaster, (2005) e Dias (2016) que verificaram que, quanto maior a quantidade de colostro fornecida e menor o tempo decorrido entre o parto e a toma de colostro, mais elevado serão os níveis de proteína sérica (correlação positiva e negativa, respetivamente).

Jaster, (2005) e Turini *et al.* (2020) demonstraram uma correlação estatisticamente significativa entre a concentração de IgG's no colostro com os níveis de proteína sérica dos vitelos, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho.

## 6. CONCLUSÃO

A transferência de imunidade passiva para o vitelo através do colostro está dependente de muitos fatores, desde o período seco da vaca até ao alojamento do vitelo. Para se obter os resultados mais corretos e viáveis, procedeu-se à recolha do máximo de dados possível.

Este estudo permitiu conhecer e adquirir dados de duas realidades completamente distintas, ficando essas diferenças vincadas em alguns dos resultados obtidos.

Em Espanha, na Granja San José, observa-se uma qualidade microbiológica do colostro irrepreensível (até mesmo se não fosse realizada pasteurização) e uma qualidade imunológica elevada. Contudo, e mesmo tendo em conta os restantes fatores relacionados com o vitelo e o colostro, verifica-se uma elevada percentagem de vitelos onde ocorre falha da transferência passiva de imunidade.

Já em Portugal, verifica-se uma grande heterogeneidade dos dados entre as explorações, sendo que o valor médio da qualidade imunológica do colostro está de acordo com o da bibliografia existente. No que concerne à prevalência de FTP, esta é bastante elevada, o que demonstra que devem ser adotadas novas estratégias de manejo nas explorações estudadas. É importante também que o produtor tenha a perceção que, numa realidade economicamente tão complicada como a atual no setor leiteiro, o melhoramento das práticas de manejo pode determinar o futuro destes animais e, conseqüentemente, melhorar a situação económica da exploração.

Verifica-se uma baixa percentagem de colostros contaminados e a ausência de correlação estatisticamente significativa entre a contaminação das amostras e a imunidade do vitelo. Contudo observa-se uma elevada incidência da presença de *Enterococcus* spp. na totalidade das amostras e, sendo este agente patogénico um contaminante ambiental, é essencial redobrar os cuidados na higiene e limpeza durante o parto, ordenha e manipulação do colostro, com especial foco nos utensílios utilizados para colheita, conservação e administração do mesmo.

Este estudo apresentou algumas limitações, como sendo o reduzido número de animais e de amostras de colostro recolhidas, a ainda vasta área geográfica a cobrir e a elevada divergência entre fatores externos à qualidade do colostro, que dificulta a obtenção de resultados reais e significativos relativamente à influência dessa qualidade na saúde do vitelo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, M. E., Mayayo, L. M. F., & Antón, J. J. R. (2013). *Colostrum. A practical guide for correct colostrum feeding in calves*. Issuu. Acedido a 1 de maio de 2021, em: [https://issuu.com/editorialservet/docs/p23750\\_colostrum\\_guidebook\\_farmer](https://issuu.com/editorialservet/docs/p23750_colostrum_guidebook_farmer)
- Aleri, J. W., Gogoi-Tiwari, J., Tiwari, H. K., Fisher, A. D., Waichigo, F. W., & Robertson, I. D. (2021). Prevalence of failure of passive transfer of immunity in dairy calves in a Mediterranean pasture-based production system of the south-west region of Western Australia. *Research in Veterinary Science*, 139, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.020>
- Anderson, N. G. (2011). Practical Aspects of Accelerated Feeding of Dairy Calves. *American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference*, 88–100. <https://doi.org/10.21423/aabppro20114002>
- Arede, M. de C. (2013). *Comparação do manejo de vitelos recém-nascidos em explorações leiteiras inglesas e americanas* [Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária]. Acedido a 1 de fevereiro de 2021, em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6095>
- Armengol, R., & Fraile, L. (2016). Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4718–4725. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10728>
- Barros, I. M. F. (2015). *Colostro Fermentado no Aleitamento de Vitelos Holtstein Friesian* [Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro]. Acedido a 1 de fevereiro de 2021, em: <https://docplayer.com.br/64106720-Universidade-de-tras-os-montes-e-alto-douro.html>
- Bartkiene, E., Bartkevics, V., Ikkere, L. E., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Lele, V., Ruzauskas, M., Bernatoniene, J., Jakstas, V., Klupsaite, D., Zadeike, D., Viskelis, P., & Juodeikiene, G. (2018). The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6787–6798. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14692>
- Baumrucker, C. R., Burkett, A. M., Magliaro-Macrina, A. L., & Dechow, C. D. (2010). Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3031–3038. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2963>

- Beam, A. L., Lombard, J. E., Koprak, C. A., Garber, L. P., Winter, A. L., Hicks, J. A., & Schlater, J. L. (2009). Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, *92*(8), 3973–3980. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2225>
- Besser, T. E., Gay, C. C., & Pritchett, L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *198*(3), 419–422.
- Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N. R., Skidmore, A. L., Godden, S., & Leslie, K. E. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *93*(8), 3713–3721. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2943>
- Borad, S. G., & Singh, A. K. (2018). Colostrum immunoglobulins: Processing, preservation and application aspects. *International Dairy Journal*, *85*, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.016>
- Bovine Alliance on Management & Nutrition. (2001). *A guide to colostrum and colostrum management for dairy calves*.
- Brown, S. (2016). *Colostrum best practice pays dividends*. Acedido a 13 de dezembro de 2020, em: <http://wynnstaydairy.uk/best-practice-pays-colostrum-dividends/>
- Chigerwe, M., Coons, D. M., & Hagey, J. V. (2012). Comparison of colostrum feeding by nipple bottle versus oroesophageal tubing in Holstein dairy bull calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *241*(1), 104–109. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.104>
- Chigerwe, M., Tyler, J. W., Schultz, L. G., Middleton, J. R., Steevens, B. J., & Spain, J. N. (2008). Effect of colostrum administration by use of oroesophageal intubation on serum IgG concentrations in Holstein bull calves. *American Journal of Veterinary Research*, *69*(9), 1158–1163. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.9.1158>
- Conneely, M., Berry, D. P., Murphy, J. P., Lorenz, I., Doherty, M. L., & Kennedy, E. (2014). Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 6991–7000. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7494>
- Cortese, V. S. (2009). Neonatal immunology. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *25*(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.003>

- Cummins, C., Berry, D. P., Murphy, J. P., Lorenz, I., & Kennedy, E. (2017). The effect of colostrum storage conditions on dairy heifer calf serum immunoglobulin G concentration and preweaning health and growth rate. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 525–535. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10892>
- Cummins, C., Berry, D. P., Sayers, R., Lorenz, I., & Kennedy, E. (2016). Questionnaire identifying management practices surrounding calving on spring-calving dairy farms and their associations with herd size and herd expansion. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, *10*(5), 868–877. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000124>
- Dairy Australia. (2017). *InCalf book for dairy farmers* (2nd Edition). Dairy Australia.
- Dairy Australia. (2020). *Rearing Healthy Calves Manual* (Edition 2nd). Acedido a 31 de março de 2021, em: <https://www.dairyaustralia.com.au/resource-repository/2020/07/09/rearing-healthy-calves-manual--second-edition>
- de Kruif, A., Opsomer, G., & Noordhuizen, J. (2007). Dairy herd health management: Current state and perspectives. *Proceedings of the 13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, *1*, 337–350.
- Deelen, S. M., Ollivett, T. L., Haines, D. M., & Leslie, K. E. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *97*(6), 3838–3844. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7939>
- Dias, S. de C. (2016). *Estudo da transferência de imunidade passiva, em vitelos, no concelho de Guimarães* [Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária]. Acedido a 13 de dezembro de 2020, em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/11641>
- Diniz, A. M. M. N. de S. (2017). *O manejo do vitelo recém-nascido: Efeito da quantidade ingerida de colostro na vitalidade dos vitelos* [Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia]. Acedido a 15 de novembro de 2020, em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/14909>
- Donahue, M., Godden, S. M., Bey, R., Wells, S., Oakes, J. M., Sreevatsan, S., Stabel, J., & Fetrow, J. (2012). Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases

- colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations. *Journal of Dairy Science*, *95*(5), 2697–2702.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5220>
- Dunn, A., Ashfield, A., Earley, B., Welsh, M., Gordon, A., McGee, M., & Morrison, S. J. (2017). Effect of concentrate supplementation during the dry period on colostrum quality and effect of colostrum feeding regimen on passive transfer of immunity, calf health, and performance. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 357–370.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11334>
- Elizondo-Salazar, J. A., & Heinrichs, A. J. (2009). Feeding heat-treated colostrum or unheated colostrum with two different bacterial concentrations to neonatal dairy calves<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, *92*(9), 4565–4571. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2188>
- Elizondo-Salazar, J. A., Jayarao, B. M., & Heinrichs, A. J. (2010). Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G concentration. *Journal of Dairy Science*, *93*(3), 961–967. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2388>
- Fecteau, G., Baillargeon, P., Higgins, R., Paré, J., & Fortin, M. (2002). Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, *43*(7), 523–527.
- Foley, J. A., & Otterby, D. E. (1978). Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review<sup>1, 2</sup>. *Journal of Dairy Science*, *61*(8), 1033–1060. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8)
- Franklin, S. T., Amaral-Phillips, D. M., Jackson, J. A., & Campbell, A. A. (2003). Health and performance of Holstein calves that suckled or were hand-fed colostrum and were fed one of three physical forms of starter. *Journal of Dairy Science*, *86*(6), 2145–2153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73804-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73804-1)
- Gelsing, S. L., Jones, C. M., & Heinrichs, A. J. (2015). Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, *98*(7), 4640–4645. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8790>
- Germano, S. (2017). Colostro: Sua importância na saúde do vitelo. *Notícias Limousine*, *25*, 78–81.
- Godden, S. M., Lombard, J. E., & Woolums, A. R. (2019). Colostrum Management for Dairy Calves. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *35*(3), 535–556. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>

- Godden, S. M., Smolenski, D. J., Donahue, M., Oakes, J. M., Bey, R., Wells, S., Sreevatsan, S., Stabel, J., & Fetrow, J. (2012). Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 4029–4040.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5275>
- Godden, S., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow, J., Wells, S., & Chester-Jones, H. (2006). Heat-Treatment of Bovine Colostrum. II: Effects of Heating Duration on Pathogen Viability and Immunoglobulin G. *Journal of Dairy Science*, *89*(9), 3476–3483. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72386-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72386-4)
- Gulliksen, S. M., Lie, K. I., & Østerås, O. (2009). Calf health monitoring in Norwegian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *92*(4), 1660–1669. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1518>
- Hammon, H. M., Zanker, I. A., & Blum, J. W. (2000). Delayed Colostrum Feeding Affects IGF-I and Insulin Plasma Concentrations in Neonatal Calves. *Journal of Dairy Science*, *83*(1), 85–92. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74859-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74859-4)
- Heinrichs, A. J., & Elizondo-Salazar, J. A. (2009). Reducing failure of passive immunoglobulin transfer in dairy calves. *Revue de Medecine Veterinaire*, *160*(8–9), 436–440.
- Heinrichs, A. J., & Jones, C. M. (2003). *Feeding the Newborn Dairy Calf*. 24.
- Hoard's Dairyman. (1990). *Calf care and raising young stock*. W.D. Hoard.
- Hogan, I., Doherty, M., Fagan, J., Kennedy, E., Conneely, M., Brady, P., Ryan, C., & Lorenz, I. (2015). Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine. *Irish Veterinary Journal*, *68*(1). <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0047-0>
- Holloway, N. M., Tyler, J. W., Lakritz, J., Carlson, S. L., & Holle, J. (2001). Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh and frozen colostrum. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *219*(3), 357–359.  
<https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.357>
- House, J. K., Gunn, A. A., Chuck, G., & McGuirck, S. M. (2015). Initial management and clinical investigation of neonate disease. Em *Large Animal Internal Medicine* (Edition 5th). Elsevier.
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*, *3*(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>

- Jaster, E. H. (2005). Evaluation of Quality, Quantity, and Timing of Colostrum Feeding on Immunoglobulin G1 Absorption in Jersey Calves\*. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 296–302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72687-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72687-4)
- Johnson, J. L., Godden, S. M., Molitor, T., Ames, T., & Hagman, D. (2007). Effects of Feeding Heat-Treated Colostrum on Passive Transfer of Immune and Nutritional Parameters in Neonatal Dairy Calves. *Journal of dairy science*, 90, 5189–5198. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0219>
- Kessler, E. C., Bruckmaier, R. M., & Gross, J. J. (2021). Short communication: Comparative estimation of colostrum quality by Brix refractometry in bovine, caprine, and ovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 2438–2444. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19020>
- Leadley, S. (2016). Colostrum Bacteria Control. *Attica Veterinary Associates*, P. C. Acedido em 15 de novembro de 2020, em: <http://www.atticacows.com/library/newsletters/cedecember2016.pdf>
- Logue, D. N., & Mayne, C. S. (2014). Welfare-positive management and nutrition for the dairy herd: A European perspective. *The Veterinary Journal*, 199(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.027>
- Lorenz, I., Mee, J., Earley, B., & More, S. (2011). Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish veterinary journal*, 64, 10. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-10>
- Mann, S., Leal Yepes, F. A., Overton, T. R., Lock, A. L., Lamb, S. V., Wakshlag, J. J., & Nydam, D. V. (2016). Effect of dry period dietary energy level in dairy cattle on volume, concentrations of immunoglobulin G, insulin, and fatty acid composition of colostrum. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1515–1526. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9926>
- Maunsell, F. (2014). *Cow Factors That Influence Colostrum Quality*. 12.
- McAloon, C. G., Doherty, M. L., Donlon, J., Lorenz, I., Meade, J., O’Grady, L., & Whyte, P. (2016). Microbiological contamination of colostrum on Irish dairy farms. *The Veterinary Record*, 178(19), 474. <https://doi.org/10.1136/vr.103641>
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: A review. *Dairy Science & Technology*, 96(2), 133–158. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
- McGuirk, S. M. (2010, Março 10). *Herd-based Problem Solving—Failure of Passive Transfer*. Yumpu.Com. Acedido a 15 de novembro de 2020, em:

<https://www.yumpu.com/en/document/read/30394292/herd-based-problem-solving-failure-of-passive-transfer>

- McGuirk, S. M., & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 20(3), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>
- Meganck, V., Hoflack, G., & Opsomer, G. (2014). *Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: A systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy.*
- Mejer, T. (2015). *Bovine colostrum and factors impacting colostrum quality in conventional and organic dairy herds.*
- Mellado, M., Torres, E., Veliz, F. G., de Santiago, A., Macias-Cruz, U., & Garcia, J. E. (2017). Effect of quality of colostrum on health, growth and immunoglobulin G concentration in Holstein calves in a hot environment. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 88(9), 1327–1336. <https://doi.org/10.1111/asj.12773>
- Mendonsa, K. M. (2011). Factors Affecting Passive Transfer in Neonatal Calves. *Dairy Science Department California Polytechnic State University*, 33.
- Mohammed, S. A. E.-M., Marouf, S. A. E.-M., Erfana, A. M., El-Jakee, J. K. A. E.-H., Hessain, A. M., Dawoud, T. M., Kabli, S. A., & Moussa, I. M. (2019). Risk factors associated with E. coli causing neonatal calf diarrhea. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 1084–1088. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.008>
- Moore, M., Tyler, J. W., Chigerwe, M., Dawes, M. E., & Middleton, J. R. (2005). Effect of delayed colostrum collection on colostral IgG concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(8), 1375–1377. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1375>
- Morin, M. P., Dubuc, J., Freycon, P., & Buczinski, S. (2021). Short communication: Diagnostic accuracy of the Petrifilm culture system for identifying colostrum with excessive bacterial contamination in Quebec dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4923–4928. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19474>
- Morrill, K. M., Conrad, E., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J., & Tyler, H. (2012). Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3997–4005. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5174>
- National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (Edition 7th). National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/9825>

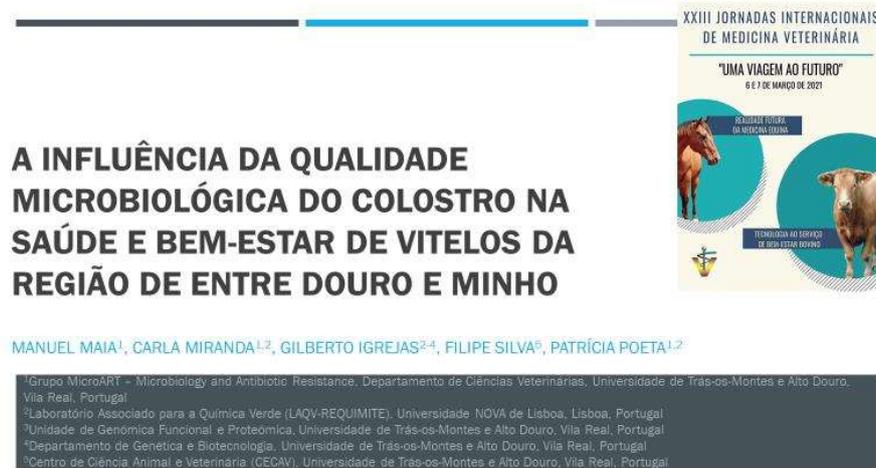
- Noordhuizen, J. P., & Wentink, G. H. (2001). Developments in veterinary herd health programmes on dairy farms: A review. *The Veterinary Quarterly*, 23(4), 162–169. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695106>
- Norman, H. D., Hutchison, J. L., & Miller, R. H. (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3880–3890. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2781>
- Ohnstad, I. (2021). *Calf Nutrition and Colostrum Management*. Acedido em 30 de abril de 2021, em: <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/calf-management/calf-nutrition-and-colostrum-management/>
- Patel, S., Gibbons, J., & Wathes, D. C. (2014). Ensuring optimal colostrum transfer to newborn dairy calves. *Cattle Practice*, 22, 95.
- Phipps, A. J., Beggs, D. S., Murray, A. J., Mansell, P. D., & Pyman, M. F. (2017). Factors associated with colostrum immunoglobulin G concentration in northern-Victorian dairy cows. *Australian Veterinary Journal*, 95(7), 237–243. <https://doi.org/10.1111/avj.12601>
- Potter, T. (2011). Colostrum: Getting the right start. *Livestock*, 16(5), 25–27. <https://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2011.00057.x>
- Poulsen, K. P., Foley, A. L., Collins, M. T., & McGuirk, S. M. (2010). Comparison of passive transfer of immunity in neonatal dairy calves fed colostrum or bovine serum-based colostrum replacement and colostrum supplement products. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(8), 949–954. <https://doi.org/10.2460/javma.237.8.949>
- Poulsen, K. P., Hartmann, F. A., & McGuirk, S. M. (2002). *Bacteria in colostrum: Impact on calf health*. 20th American College of Internal Veterinary Medicine, St. Louis (MO).
- Quigley, J. (1997). *Calf Note #13—Freezing & thawing colostrum*. 1.
- Quigley, J. (2001a). *Calf Note #11—Timing of colostrum feeding*. 2.
- Quigley, J. (2001b). *Calf Note #39 – Using a refractometer*. 5.
- Quigley, J. D., & Drewry, J. J. (1998). *SYMPOSIUM: PRACTICAL CONSIDERATIONS OF TRANSITION COW AND CALF MANAGEMENT Nutrient and Immunity Transfer from Cow to Calf Pre- and Postcalving*.
- Renaud, D. L., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Haley, D. B., Jalbert, A. B., & Duffield, T. F. (2017). Validation of commercial luminometry swabs for total bacteria and coliform

- counts in colostrum-feeding equipment. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 9459–9465. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13228>
- Renaud, D. L., Steele, M. A., Genore, R., Roche, S. M., & Winder, C. B. (2020). Passive immunity and colostrum management practices on Ontario dairy farms and auction facilities: A cross-sectional study. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8369–8377. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18572>
- Richards, R. (2015). Harvesting Colostrum. *Focus on Calves*, 6–7.
- Roussel, A. J. (2009). Non-diarrheal diseases of calves (Proceedings). *DVM 360*. Acedido a 15 de novembro de 2020, em: <https://www.dvm360.com/view/non-diarrheal-diseases-calves-proceedings>
- Santos, G. dos, Silva, J. T. da, Santos, F. H. da R., Bittar, C. M. M., Santos, G. dos, Silva, J. T. da, Santos, F. H. da R., & Bittar, C. M. M. (2017). Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(1), 72–79. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000100011>
- Shivley, C. B., Lombard, J. E., Urie, N. J., Weary, D. M., & Keyserlingk, M. A. G. von. (2019). Management of preweaned bull calves on dairy operations in the United States. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4489–4497. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15100>
- Sims, L., Pinedo, P., & Donovan, G. (2015). *Health and performance of calves fed fresh colostrum from their dams compared to those fed stored colostrum from non-dams*. 49, 13–17.
- Šlosárková, S., Pechová, A., Staněk, S., Fleischer, P., Zouharová, M., & Nejedlá, E. (2021). Microbial contamination of harvested colostrum on Czech dairy farms. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19949>
- Solomons, N. W. (2002). Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrum concentrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 Suppl 3, S24-28. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601480>
- Steele, M. L., McNAB, W. B., Poppe, C., Griffiths, M. W., Chen, S., Degrandis, S. A., Fruhner, L. C., Larkin, C. A., Lynch, J. A., & Odumeru, J. A. (1997). Survey of Ontario Bulk Tank Raw Milk for Food-Borne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 60(11), 1341–1346. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.11.1341>
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., & Wheeler, T. T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 87(13 Suppl), 3–9. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>

- Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., & Ferrouillet, C. (2005). Preventing Bacterial Contamination and Proliferation During the Harvest, Storage, and Feeding of Fresh Bovine Colostrum. *Journal of Dairy Science*, *88*(7), 2571–2578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72933-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7)
- Sutter, F., Borchardt, S., Schuenemann, G. M., Rauch, E., Erhard, M., & Heuwieser, W. (2019). Evaluation of 2 different treatment procedures after calving to improve harvesting of high-quantity and high-quality colostrum. *Journal of Dairy Science*, *102*(10), 9370–9381. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16524>
- Tao, S., & Dahl, G. E. (2013). Invited review: Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *Journal of Dairy Science*, *96*(7), 4079–4093. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6278>
- Trotz-Williams, L. A., Leslie, K. E., & Peregrine, A. S. (2008). Passive Immunity in Ontario Dairy Calves and Investigation of Its Association with Calf Management Practices. *Journal of Dairy Science*, *91*(10), 3840–3849. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0898>
- Trujillo, A. J., Castro, N., Quevedo, J. M., Argüello, A., Capote, J., & Guamis, B. (2007). Effect of Heat and High-Pressure Treatments on Microbiological Quality and Immunoglobulin G Stability of Caprine Colostrum. *Journal of Dairy Science*, *90*(2), 833–839. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71567-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71567-9)
- Turini, L., Conte, G., Bonelli, F., Sgorbini, M., Madrigali, A., & Mele, M. (2020). The relationship between colostrum quality, passive transfer of immunity and birth and weaning weight in neonatal calves. *Livestock Science*, *238*, 104033. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104033>
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E., & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *14*(6), 569–577. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2000\)014<0569:ptocii>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2000)014<0569:ptocii>2.3.co;2)
- Williams, D. R., Pithua, P., Garcia, A., Champagne, J., Haines, D. M., & Aly, S. S. (2014). Effect of Three Colostrum Diets on Passive Transfer of Immunity and Preweaning Health in Calves on a California Dairy following Colostrum Management Training. *Veterinary Medicine International*, *2014*, 698741. <https://doi.org/10.1155/2014/698741>

## 8. ANEXOS

Anexo I - Capa da Apresentação Oral realizada nas XXIII Jornadas Internacionais de Medicina Veterinária



Anexo II - Abstract presente no *Book of Abstracts* do 4th IC<sup>2</sup>AR 2021

POSTER PRESENTATIONS

**P.11 – Microbiological composition of colostrum consumed by Portuguese dairy calves**

**Manuel Maia<sup>1\*</sup>, Carla Miranda<sup>1,2</sup>, Gilberto Igrejas<sup>2,4</sup>, Filipe Silva<sup>5</sup>, Patrícia Poeta<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Microbiology and Antibiotic Resistance Team (MicroART), Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal. <sup>2</sup>Associated Laboratory for Green Chemistry (LAQV-REQUIMITE), University NOVA of Lisboa, Lisboa, Caparica, Portugal. <sup>3</sup>Functional Genomics and Proteomics Unit, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal. <sup>4</sup>Department of Genetics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal. <sup>5</sup>Veterinary and Animal Research Centre (CECAV), University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal.  
\*Email: manuel\_maia89@hotmail.com

**Abstract**  
The microbiological quality of colostrum supplied to calves is an often factor overlooked by dairy farms, resulting from the management with consequences to the calf health. This can determine the success (or failure) in the passive immunity transfer to the calf, as well as, the pathogens transfer and antimicrobial resistance [1,2,3]. In this study, the aim was to evaluate the microbiological quality of colostrum in 12 dairy farms in the Portuguese of Douro and Minho regions. From 37 samples, the total bacterial count present in PCA agar was performed. The presence of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* (indicators of fecal contamination) and *Staphylococcus aureus* were studied together with their resistance to vancomycin, cefotaxime and methicillin, respectively. Each sample was grown in Slanetz-Bartley agar (+vancomycin 4µg/ml), Levine EMB (+cefotaxime 2µg/ml) and MSA agar (Chromagar MRSA), respectively, and incubated at 37°C for 24h. The identification of the isolates was confirmed by routine biochemical methods. From the 37 colostrum samples, 16% had a high microbial load ( $\geq 10^6$  cfu/ml) and 86% showed growth of, at least, one of the 3 bacterial strains investigated. In 5% of samples was identified the presence of *Staphylococcus aureus*, in 13% *Escherichia coli* and in 78% *Enterococcus faecalis*. No resistance to the above-mentioned antibiotics was found. In conclusion, this work showed a high percentage of samples with fecal contaminants, in particular *Enterococcus faecalis*, present in calve colostrums, although antimicrobial resistances were no observed.

**Keywords:**  
Colostrum, Calves, Microbiological Contamination, Antimicrobial Resistances

**References**  
[1] S.M. Godden, J.E. Lombard, A.R. Woolums, *Vet Clin North Am Food Anim Pract* (2019) 35(3), 535-556.  
[2] J.A. Elizondo-Salazar, B.M. Jayarao, B. A.J. Heinrichs, *J Dairy Sci* (2010) 93, 961-967.  
[3] S.M. McGuirk, M. Collins, *Vet Clin North Am Food Anim Pract* (2004).

**Acknowledgements**  
This work was funded by the R&D Project CAREBIO2, with reference NORTE-01-0145-FEDER-030101 and PTDC/SAU-INF/30101/2017, financed by the European Regional Development Fund (ERDF) through the Northern Regional Operational Program (NORTE 2020) and the Foundation for Science and Technology (FCT). This work was supported by the Associate Laboratory for Green Chemistry - LAQV which is financed by national funds from FCT/MCTES (UIDB/50006/2020 and UIDP/50006/2020).

Anexo III - Tabela Utilizada para Recolher os Dados de Cada Exploração

Nº Amostra	ID Vitelo	Sexo	Hora e Dia do Parto	Tipo de Parto <sup>(1)</sup> e Tamanho do Vitelo <sup>(2)</sup>	ID Vaca (Colostro)	Data e Hora Colheita	Qualidade Colostro	Dia e Hora da Toma	Quantidade e Método Toma <sup>(3)</sup>	Proteína Sérica
<p>(1) SA – Sem Ajuda, CAF – Com Ajuda Fácil, CAD – Com Ajuda Difícil, C – Cesariana  (2) 1 – Pequeno, 2 – Médio, 3 – Grande  (3) B – Balde, BT – Balde com Tetina/Biberão, SE – Sonda Esofágica</p>										