

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ESCORE DE ENCHIMENTO RUMINAL COMO FERRAMENTA DE
MONITORAMENTO DA SAÚDE EM VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE
TRANSIÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

OTÁVIO BACKES MEOTTI

Uruguaiiana, RS, Brasil
2017

OTÁVIO BACKES MEOTTI

**ESCORE DE ENCHIMENTO RUMINAL COMO FERRAMENTA DE
MONITORAMENTO DA SAÚDE EM VACAS LEITEIRAS NO
PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Noro

**Uruguaiiana
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M551e Meotti, Otávio Backes

Escore de enchimento ruminal como ferramenta de
monitoramento de saúde em vacas leiteiras durante o período de
transição. / Otávio Backes Meotti.

53 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2017.

"Orientação: Mirela Noro".

1. Monitoramento de Rebanho . 2. Período de transição. 3.
Vacas leiteiras. 4. Saúde. 5. Escore de enchimento ruminal. I.
Título.

OTÁVIO BACKES MEOTTI

**ESCORE DE ENCHIMENTO RUMINAL COMO FERRAMENTA DE
MONITORAMENTO DA SAÚDE EM VACAS LEITEIRAS NO
PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Dissertação defendida e aprovada em março de 2017.
Banca examinadora:

Profa Dra Mirela Noro
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Orientadora

Profa. Dra. Deise Castagnara
Universidade Federal do Pampa– UNIPAMPA

Prof. Dr. Alfredo Quites Antoniazzi
Universidade Federal de Santa Maria -UFSM

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual tem me protegido e dado forças para continuar minha caminhada, não me desamparando nas adversidades que surgem em meu caminho e no de minha família, abençoando-nos a cada dia mais.

Não menos importante, agradeço a minha família, ao meu pai Edgar, minha mãe Sandra e minha irmã Bruna, meus anjos, meu esteio. Certamente sem o apoio deles esse trabalho não seria possível.

Aos amigos que conquistei durante esses dois anos onde sempre me ampararam, ajudaram e fizeram essa fase inesquecível com muitas histórias para contar.

A fazenda Santa Isabel, qual me acolheu muito bem para realização do experimento.

Ao ACVet que me proporcionou o convívio e aprendizado com vários “personagens”.

E por fim, a minha orientadora Mirela Noro e meu amigo Chester Patrique Batista, pois sem os seus ensinamentos jamais conseguiria ter concretizado o presente estudo.

“A teoria é esplêndida, mas enquanto não for colocada em prática, não tem valor algum.”

James C. Penney

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Universidade Federal do Pampa

ESCORE DE ENCHIMENTO RUMINAL COMO FERRAMENTA DE MONITORAMENTO DA SAÚDE EM VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

AUTOR: Otávio Backes Meotti

ORIENTADORA: Mirela Noro

Uruguaiana-RS, Março de 2017.

O período de transição é uma fase crítica na vida produtiva das vacas leiteiras, devido ao aumento do seu requerimento nutricional, concomitante a uma redução fisiológica na ingestão de matéria seca, e comprometimento imune. Devido a estes fatores, este período se associa a um estado catabólico, com alta incidência de enfermidades metabólico-nutricionais e infecciosas, que levam a perdas econômicas e deterioro do bem-estar animal. Como muitas dessas enfermidades são antecedidas por uma diminuição na ingestão de matéria seca (IMS), a avaliação de indicadores relacionados ao consumo poderiam servir para prever o risco de doenças, durante o período de transição. Como o escore de enchimento ruminal (EER) apresenta uma boa correlação com IMS a presente dissertação teve dois objetivos: 1- correlacionar e comparar os escores de enchimento ruminal (EER, 1 a 5) com indicadores sanguíneos do balanço energético e mineral. 2- validar o escore de enchimento ruminal como ferramenta de monitoramento de saúde e taxa de retorno a ciclicidade em vacas leiteiras no período pré-parto. Para responder aos objetivos realizou-se um estudo de coorte com 113 vacas multíparas Holstein, e os resultados de cada objetivo são apresentados em 2 artigos separados. Para responder ao objetivo 1 foram coletados semanalmente nas semanas -2,-1, parto, +1,+2,+3, uma amostra de sangue para analisar as concentrações de β OH-butirato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (NEFA), colesterol e cálcio, e aferido simultaneamente o EER e escore de condição corporal (ECC) das vacas. Nesse estudo comprovou-se que o EER correlacionou-se principalmente com o ECC. Também, se observou que o EER associou-se com indicadores sanguíneos estudados tanto no período pré como pós-parto, sendo que vacas com maiores EER (EER3) apresentaram maiores concentrações de

cálcio, BHBA e colesterol no pré-parto. Já, no pós-parto vacas com EER1 tiveram valores maiores de NEFA e menores de colesterol que vacas com EER3. Para responder ao objetivo 2 mensurou-se o EER nas semanas -2, -1 e parto, diagnosticou-se a ocorrência de doenças clínicas e avaliou-se o regresso a ciclicidade entre a 4^o e 8^o semana pós-parto. Determinou-se o EER como preditor das doenças mais prevalentes (metrite, mastite, retenção placentária, deslocamento de abomaso e afecções podais). Observou-se que o $EER \leq 2$ duas semanas antes do parto foi um bom preditor de todas as doenças acima descritas, com sensibilidade variando de 53% a 75% e especificidade de 80%. Por outro lado, vacas com EER1 durante o pré-parto e parto voltaram mais tardiamente a ciclicidade e em menor porcentagem quando comparadas com vaca com EER3. Portanto o escore de enchimento ruminal correlacionou-se com os indicadores sanguíneos durante período de transição, bem como serviu como preditor para as doenças do período de transição e regresso a ciclicidade, podendo ser utilizado como ferramenta de monitoramento da saúde de vacas leiterias múltíparas.

Palavras chave: Monitoramento, ingestão de matéria seca, escore visual.

ABSTRACT

Dissertation of Master`s Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

RUMEN FILL AS A HEALTH MONITORING TOOL IN TRANSITION DAIRY COWS

AUTHOR: Otávio Backes Meotti

ADVISOR: Mirela Noro

Uruguaiiana, March, 2017.

The transition period is a critical phase in the productive lives of dairy cows, due to the increase in their nutritional requirement, concomitant with a physiological reduction in dry matter intake, and immune compromise. Due to these factors, this period is associated with a catabolic state, with a high incidence of metabolic-nutritional and infectious diseases, leading to economic losses and deterioration of animal welfare. Since many of these diseases are preceded by a decrease in dry matter intake (DMI), the evaluation of consumption indicators could serve to predict disease risk during the transitional period. As the rumen fill score (RFS) presents a good correlation with DMI, the present dissertation had two objectives: 1 – To correlate and compare rumen fill (RFS, 1 to 5) with blood indicators of negative energy balance. 2 – To validate the rumen fill score as a health monitoring tool and rate of return to cyclicity when it comes to dairy cows' pre-calving. In order to answer the objectives, a cohort study was carried out with 113 Holstein multiparous cows, and the results of each objective are presented in 2 separate articles. To respond to objective 1 blood samples were collected to analyze the concentrations of β OH-butyrate (BHBA), non-esterified fatty acids (NEFA), cholesterol and calcium at week -2, -1, calving, + 1, + 2, +3, and simultaneously, RFS and cow's body condition score (BCS) were measured. It was verified in this study that the RFS is correlated mainly with the BCS. Also, it was observed that the RFS was associated with blood indicators studied in pre and post partum periods, and cows with higher RFS (RFS 3) had higher concentrations of calcium, BHBA and cholesterol in prepartum. In the postpartum period, cows with RFS 1 had higher NEFA values and lower cholesterol than cows with RFS 3. To respond to objective 2, the RFS was measured at week -2, -1 and

calving, clinical diseases were diagnosed and the return to cyclicity between the 4th and 8th week postpartum was evaluated. RFS was determined as a predictor of the most prevalent diseases (metritis, mastitis, placental retention, displaced abomasum and lameness). It was observed that $EER \leq 2$ two weeks before calving was a good predictor of all diseases described above, with sensitivity varying from 53% to 75% and specificity of 80%. On the other hand, cows with EER1 during prepartum and calving returned to cyclicity later and in a lower percentage when compared to cows with EER3. Therefore, the ruminal filling score correlated with the blood indicators during the transitional period, and served as a predictor for the diseases of the transition period and return to cyclicity. It can be used as a monitoring tool for the health of multiparous dairy cows.

Key words: Monitoring, dry matter intake, visual score.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura artigo 2

Figura 1: Retorno a ciclicidade de acordo com escore de enchimento ruminal (EER3 —; EER2 ---; EER1 ...) na A. -2 semana pré-parto, B. - 1 semana pré-parto e C. no dia do parto em vacas múltíparas..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabelas artigo 1

Tabela 1:	Tabela com ingredientes e composição nutricional da dieta pré e pós-parto com base na matéria seca.....	24
Tabela 2:	Critérios utilizados para classificar os diferentes escores de enchimento ruminal.....	25
Tabela 3:	Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores sanguíneos e do escore de condição corporal (ECC) (média ± EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de vacas durante o período de transição pré-parto.....	26
Tabela 4:	Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores sanguíneos e do escore de condição corporal (ECC) (média ± EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de vacas no dia do parto.....	27
Tabela 5:	Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores de saúde e do escore de condição corporal (ECC) (média ± EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de multíparas durante o período de transição pós-parto.....	28
Tabela 6:	Valores da correlação de Spearman (ρ) do escore de enchimento ruminal e indicadores sanguíneos durante o período de transição (-3 a + 3 semana em relação ao parto) em vacas multíparas.....	28

Tabelas artigo 2

Tabela 1:	Tabela com ingredientes e composição nutricional da dieta pré e pós-parto com base na matéria seca.....	38
Tabela 2:	Critérios utilizados para classificar os diferentes escores de enchimento ruminal (Zaaijer e Noordhuizen, 2003)	39
Tabela 3:	Incidência dos eventos clínicos em vacas multíparas durante o período de transição.....	41
Tabela 4:	Avaliação diagnóstica dos escores de enchimento ruminal na 2 ^a semana pré-parto como preditor doenças do período de transição.....	41
Tabela 5:	Tempo (média em dias, IC 95%) e porcentagem de vacas que retornaram a ciclicidade dependendo do escore de enchimento ruminal apresentado na respectiva semana pré-parto.....	42

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
3.ARTIGOS CIENTÍFICOS	20
3.1 ARTIGO 1	21
3.2 ARTIGO 2	34
4. CONCLUSÃO	49
5.REFERÊNCIAS	50

1.INTRODUÇÃO

Período de Transição

O período de transição consiste nas três semanas que antecedem o parto e três semanas posteriores a ele. Esse período é o de maior incidência de doenças durante a vida produtiva da vaca. Onde até 75% do rebanho pode cursar com alguma doença clínica ou subclínica (LeBlanc et al., 2006). Neste período existem relatos de 56% de doenças clínicas ou subclínicas em sistemas pastoris (Sepulveda-Varas et al., 2015) ou de 68% em regime estabulado (Schirmann et al., 2016). Um estudo, no noroeste do Rio Grande do Sul relatou uma incidência de 80,7% de doenças clínicas e subclínicas durante este período, sendo que as doenças clínicas afetaram 26,3% das vacas (Bondan, 2015).

A elevada incidência de transtornos de saúde durante o período de transição, pode estar associada à adaptação metabólica e física que ocorre durante essa fase. Pois, durante esse período a vaca aumenta sua demanda energética e mineral, para crescimento fetal, produção colostrar e láctea no início da lactação (Hayirli et al., 2002). Tudo isso aliado a diminuição na ingestão da matéria seca (IMS), leva a um balanço energético negativo (BEN), e concomitante mobilização das reservas corporais (Grummer et al., 2004). A diminuição voluntária da IMS nas vacas leiteiras é considerada fisiológica, porém não se sabe quais são os reais mecanismos que desencadeiam tal diminuição. Contudo, existem vários fatores que interligados levam uma redução no consumo.

O primeiro fator que leva a diminuição da IMS é uma limitação física, pois durante o terço final da gestação o feto ocupa um grande espaço na cavidade abdominal, reduzindo assim a possibilidade do rúmen encher por completo (Grummer et al., 2004). Os outros fatores, que impactam negativamente na IMS, além de comprometer o sistema imune, são as variações hormonais e metabólicas. Por exemplo, o estrógeno liberado pela placenta causa uma diminuição na IMS nos dias que antecedem o parto, e junto com este hormônio, o cortisol e a progesterona geram disfunção na expressão dos genes apoptóticos dos neutrófilos, comprometendo o sistema imune (Burton et al., 2005). Quanto aos fatores metabólicos, o aumento dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) e do β OH-butirato (BHBA) circulantes, produzidos pela mobilização lipídica e BEN, parecem exacerbar na diminuição da IMS (Ingvarstsen e Andersen, 2000).

Os fatores metabólicos não só podem influenciar a IMS, como também podem levar a alterações no sistema imune. Onde elevadas concentrações de NEFA e BHBA alteram a viabilidade e capacidade fagocítica dos neutrófilos (Roche et al., 2013) . Da mesma forma, vacas com hipocalcemia subclínica também apresentam uma diminuição na capacidade fagocítica dos seus neutrófilos (Martinez et al., 2012). Sendo assim, o comprometimento do metabolismo energético e do cálcio durante o peri-parto aumenta o risco de ocorrência de doenças. Pois comprometem o suprimento de glicose e Ca^{2+} para o sistema imune das vacas leiteiras (Roche et al., 2013). Portanto devido à diminuição da IMS, alterações metabólicas o período de transição tem a maior incidência de doenças durante a vida produtiva das vacas leiteiras. Sendo necessário o monitoramento do rebanho durante esse período para diminuir as perdas econômicas.

Parâmetros sanguíneos de monitoramento de saúde

Os principais parâmetros de utilizados para monitorar a saúde em vacas leiteiras são as concentrações sanguíneas de NEFA, BHBA e cálcio (Roberts et al., 2012). Outros indicadores também estudados são a insulina, fatores inflamatórios e o colesterol (Sepulveda-Varas et al., 2015, Bicalho et al., 2017).

Os indicadores do metabolismo energético mais utilizados atualmente, como marcadores de saúde, são os NEFA, liberados ao sangue a partir da lipomobilização, e o BHBA associado à oxidação dos NEFA, decorrente do BEN. Vacas leiteiras com concentrações séricas de NEFA maiores a 0,3 mmol/L no pré-parto, e maiores a 0,6 mmol/L no pós-parto possuem maior risco de metrite, deslocamento de abomaso e cetose (Ospina et al., 2010). Já, aquelas com concentrações séricas de BHBA acima de 1,0 mmol/L no pós-parto tem 3,5 mais risco de desenvolver deslocamento de abomaso (Ospina et al., 2010). Enquanto que vacas entre 3 e 7 dias de lactação com BHBA >1,2 mmol/L apresentam 6,1 mais chance de apresentar deslocamento de abomaso e 4,5 vezes mais chance de serem descartadas (McArt et al., 2012).

Já o cálcio é um elemento mineral necessário para a secreção do colostro, produção láctea, contração muscular e para o adequado funcionamento do sistema imune. Estudos demonstraram que vacas com calcemia <2,14 mmol/L tiveram comprometimento da função dos neutrófilos circulantes, e maior incidência de metrite comparadas com vacas com calcemias maiores (Martinez et al., 2012). Portanto a calcemia seria um preditor de saúde de utilidade durante o período de transição.

Apesar do NEFA, BHBA e da calcemia serem utilizados como marcadores de saúde nos rebanhos leiteiros, seu uso ainda é pouco difundido, por diversos fatores. No caso do NEFA e do BHBA suas limitações estão associadas às variações que sofrem ao longo do período de transição, assim como pelo alto custo analítico (Lukas et al., 2015). NEFA é um melhor preditor de pré-parto, enquanto BHBA é um melhor preditor no de pós-parto, já que ambos não estão associados entre si, a pesar de NEFA ser precursor metabólico de BHBA (McCarthy et al., 2015). Desta forma, seria adequado contar com outros indicadores de origem energética que pudessem servir como preditores tanto no pré como no pós-parto. A este respeito sugere-se que o colesterol poderia ser o marcador em questão. Estudos relataram que a colesterolemia está relacionada com a IMS (Guretzky et al., 2006), e que vacas com menores colesterolemias apresentaram múltiplos eventos clínicos durante o período de transição (Sepulveda-Varas et al., 2015).

Parâmetros comportamentais de monitoramento de saúde

Apesar de vários estudos avaliarem os valores preditivos dos indicadores metabólicos sobre a ocorrência dos transtornos do período de transição, na maioria destes estudos não fica claro se a predição observada foi estabelecida como causa ou como consequência dos transtornos em questão (Roberts et al., 2012). Estudos na área confirmam que as vacas leiteiras sofrem várias alterações fisiológicas que as tornam mais suscetíveis as enfermidades, e os metabólitos sanguíneos se modificam em decorrência destas alterações. Porém, aparentemente prévias as modificações metabólicas e da ocorrência dos transtornos do período de transição, as vacas apresentam mudanças comportamentais que seriam preditores mais precoces da ocorrência de doenças (Weary et al., 2009). Entre os marcadores comportamentais estudados estão os tempos destinados as atividades diárias, como o de caminhada, ruminação, decúbito, estação e de ingestão (Stangaferro et al., 2016).

Nesta linha de estudo de comportamento, foi observado mediante pedômetro, que vacas com deslocamento de abomaso tiveram maior atividade de caminhada durante os 14 dias pós-parto. Já, vacas que apresentaram cetose tiveram uma menor atividade nos dias 2 a 5 pós-parto, aumentando a frequência de atividades após este período, comparada com vacas saudáveis (Edwards e Tozer, 2004). Outra linha de pesquisa de comportamento, está associado ao comportamento ingestivo. Por exemplo, já se associou a ocorrência de doenças

com mudanças comportamentais, tais com diminuição da frequência e do tempo de visitas ao cocho. Vacas no período de transição com cetose subclínica visitaram o cocho com menor frequência e apresentaram menor tempo de consumo que vacas saudáveis (Goldhawk et al., 2009). Da mesma forma, vacas com hipocalcemia subclínica tiveram menor IMS nas duas semanas antes do parto, bem como permaneceram maior tempo em pé no dia do parto (Jawor et al., 2012). Similar, vacas com cetose subclínica e, vacas com cetose subclínica e metrite concomitante, apresentaram 15% e 17% de redução da IMS uma semana antes do parto, respectivamente, quando comparadas com vacas saudáveis (Schirmann et al., 2016). Da mesma forma que vacas com metrite dedicaram menor tempo à ingestão de alimento uma semana antes do parto, do que vacas saudáveis (Huzzey et al., 2007).

Atualmente, o comportamento dos rebanhos pode ser monitorado com uso de colares comerciais que detectam as atividades diárias (acelerômetros), entre elas tempo de atividade, ruminação e ócio (Stangaferro et al., 2016). Seu uso tem permitido avaliar alterações nas atividades diárias que podem estar associadas a um maior risco de doenças. Em pesquisa utilizando colares como ferramenta de monitoramento, observou-se que vacas com metrite e retenção placentária ruminaram por menor tempo no pré-parto que vacas saudáveis. Similar, vacas que apresentaram cetose subclínica dedicaram menor tempo as atividades diárias no pós-parto, comparadas com controles (Liboreiro et al., 2015). Da mesma forma, vacas que desenvolveram cetose subclínica concomitante a uma doença clínica ruminaram por menor tempo uma semana antes do parto, quando comparadas com vacas saudáveis. Assim, a alta taxa de ruminação uma semana antes do parto foi considerada um fator de proteção para desenvolvimento de cetose subclínica concomitante a uma doença clínica (OR=0,5) ou apenas cetose subclínica (OR=0,6) (Kaufman et al., 2016).

Conforme apresentado, dentro dos aspectos comportamentais que mais se associam com a ocorrência de transtornos do período de transição estão aqueles relacionados aos hábitos de ingestão das vacas leiteiras, os quais podem ser monitorados parcialmente com o uso dos colares acelerômetros. Entretanto, a aquisição destes equipamentos é bastante onerosa, inviabilizado seu uso na maioria dos sistemas produtivos (Espadamala et al., 2016).

Portanto é necessário a busca por novos marcadores de saúde em vacas leiteiras, os quais deveriam estar fortemente relacionados com o equilíbrio fisiológico da vaca (Lukas et al., 2015). Uma alternativa de baixo custo para estimar o comportamento ingestivo, é a aferição do escore de enchimento ruminal. Porém, esse não está somente relacionado a quantidade de matéria seca ingerida, pois depende da composição da ração, que impacta na taxa de

passagem e volume interno do rúmen. Com isso dietas com maior digestibilidade tendem a maior taxa de passagem, ocupando menor espaço ruminal (Dado e Allen, 1995). Já dietas com elevada fibra em detergente neutro (FDN) e maior tamanho de partícula tem menor taxa de passagem ruminal, e um maior efeito residual (Kammes e Allen, 2012). Mais um fator que influencia no enchimento ruminal é o tamanho interno desse, onde vacas no pré-parto tem menor volume de rúmen (Dado e Allen, 1995). Do mesmo modo, o enchimento ruminal também sofre influência do comportamento alimentar podendo ter variação durante o dia. Mas mesmo com tantas variáveis a IMS explica em 46% o EER ($r=0,68$) (Burfeind et al., 2010).

Devido a associação entre o EER e o consumo de matéria seca, ele vem sendo pesquisado como ferramenta de monitoramento. Zaaijer 2003, sugere que vacas com baixo EER precisam ser monitoradas, visando detectar desvios iminentes no desempenho nutricional e minimizar problemas de infertilidade numa fase precoce lactacional. Já Kawashima 2016, encontrou que vacas que não conceberam na primeira inseminação tiveram uma diminuição do EER no pré-parto. Entretanto, o EER ainda não foi associado com indicadores sanguíneos nem como preditor de doenças durante o período de transição de vacas.

Portanto tendo por base os antecedentes apresentados planteamos duas hipóteses. A primeira é que o escore de enchimento ruminal está associado com as concentrações plasmáticas de indicadores de metabolismo energético e mineral em vacas leiteiras no período de transição. Nossa segunda hipótese é que o escore de enchimento ruminal é um preditor pré-parto da ocorrência de transtornos clínicos e da taxa de retorno a ciclicidade em vacas leiteiras.

2.OBJETIVOS

2.1 GERAL

Validar o escore de enchimento ruminal como ferramenta de monitoramento dos transtornos de saúde no período de transição de vacas leiteiras.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar e correlacionar o escore de enchimento ruminal com as concentrações de indicadores do metabolismo energético e mineral durante o período de transição.
2. Avaliar o escore de enchimento ruminal como preditor pré-parto de doenças clínicas e taxa de retorno a ciclicidade em vacas leiteiras no período de transição.

3.ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências bibliográficas encontram-se nos manuscritos.

3.1 ARTIGO 1

Associação entre o escore de enchimento ruminal e indicadores metabólicos de saúde em vacas leiteiras durante o período de transição.

O. B. Meotti*, C. P. Batista†, R. Gretel‡ e M. Noro*

* Hospital Veterinário, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

† Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

‡ Laboratório de Técnicas Nucleares, Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade da República do Uruguai, Montevideú, Uruguai.

Resumo

O período de transição compreende as três semanas antes do parto e três semanas posteriores ao parto. Durante essa fase ocorre um incremento na demanda nutricional e uma redução na ingestão de matéria seca. Fazendo com que as vacas sofram alterações metabólicas para atender as demandas geradas pela lactação. A soma de todos esses fatores faz com esse período seja o de maior incidência de doenças durante a vida produtiva das vacas leiteiras. Com isso, tem sido avaliados diversos indicadores para o monitoramento da saúde das vacas durante esse período. Entre eles os indicadores sanguíneos como NEFA, BHBA e cálcio; e os comportamentais como o tempo de ruminção, taxa de bocados, tempo de permanência no cocho e ingestão de matéria seca. Entretanto a pesar do escore de enchimento ruminal (EER) apresentar uma correlação com a ingestão de matéria seca, seu uso ainda não foi validado. Dessa forma o objetivo do estudo foi relacionar o escore de enchimento ruminal com os indicadores sanguíneos de balanço energético e mineral em vacas leiteiras durante o período de transição. Dessa forma realizou-se um estudo de coorte com 113 vacas multíparas Holstein. Onde foram coletados semanalmente nas semanas -2, -1, parto, +1,+2,+3, uma amostra de sangue para analisar as concentrações de β OH-butirato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (NEFA), cálcio e colesterol, e aferido simultaneamente o EER (1 a 5) e escore de condição corporal (ECC) das vacas. Realizou-se uma análise de variância, não qual foram analisados separadamente os períodos pré-parto, parto e pós-parto. Considerando como variáveis dependentes, o escore de condição corporal, concentrações de cálcio, NEFA, BHBA

e colesterol. E como variáveis independentes a semana de lactação, escore de enchimento ruminal, assim como sua interação. Para correlacionar o EER com as concentrações dos indicadores sanguíneos utilizou-se a correlação de Spearman, com modelos separados para todas as semanas. Observou-se que vacas com maior escore de enchimento ruminal pré-parto cursaram com um melhor estatus energético e cálcio. Da mesma forma vacas com EER3 pós-parto apresentaram melhor balance energético que aquelas com EER1. A associação observada entre o EER e os indicadores energéticos e a calcemia especialmente no pré-parto indicam que pode ser utilizado como uma ferramenta de monitoramento da saúde do rebanho.

Introdução

O período de transição é uma fase crítica na vida produtiva da vaca leiteira. Pois nesse período a vaca deixa de ser gestante e passa a ser lactante. Dessa forma há um incremento significativo nos seus requerimentos de metabólicos. Esse aumento da demanda de nutrientes vem acompanhada de uma diminuição da ingestão de matéria seca, ocasionando assim um balanço energético negativo (Grummer et al., 2004).

Com isso para manter a lactação a vaca utiliza suas reservas corporais sofrendo assim adaptações endócrinas e metabólicas. Essas adaptações impactam negativamente no sistema imune das vacas, fazendo como que as duas semanas pós-parto seja o período de maior incidência de doenças na vida produtiva das vacas (Bradford et al., 2015). Portanto, se faz necessário o monitoramento da saúde das vacas leiteiras durante o período de transição.

Existem diversos metabólitos indicadores que podem predizer as doenças que ocorrem durante o período de transição. Entre eles, os ácidos graxos não esterificados (NEFA) quando ≥ 300 mEq/L durante o pré-parto estão associados a um maior risco das vacas apresentarem doenças no pós-parto (Ospina et al., 2010). Outro um indicador sanguíneo é o β OH-butirato (BHBA). Vacas com concentrações $>1,2$ mmol/L de BHBA entre o 3° e 7° dia de lactação apresentaram 4,5 vezes mais chance de serem descartadas e 6,1 mais chance de apresentarem deslocamento de abomaso (DA) (McArt et al., 2012). Já vacas com concentrações de BHBA $>1,0$ mmol/L no pós-parto tiveram 3,5 mais risco de desenvolver DA (Ospina et al.). Por outro lado a determinação da calcemia também tem sido utilizada como preditor de saúde é o cálcio. Estudos demonstraram que vacas com calcemia $<2,14$ mmol/L no 3° dia de lactação, tiveram 3,24 mais risco de desenvolver metrite quando comparadas com vacas com calcemias maiores (Martinez et al., 2012).

Além desses indicadores sanguíneos de saúde em vacas leiteiras também temos o colesterol, visto foi observado que vacas com menores colesterolemias apresentaram múltiplos eventos clínicos durante o período de transição (Sepulveda-Varas et al., 2015). A possível associação entre a ocorrência de doenças em vacas e a colesterolemia, estaria relacionada a relação direta entre a colesterolemia e o consumo de matéria seca (Guretzky et al., 2006). Outra alternativa de monitoramento e diagnóstico precoce das enfermidades durante o período de transição é a quantificação de ingestão de matéria seca (Jawor et al., 2012). Porém o monitoramento individual do consumo de matéria seca nos atuais sistemas produtivos não é economicamente viável (Espadamala et al., 2016). Portanto, tendo o escore de enchimento ruminal boa relação com o consumo de matéria seca (Burfeind et al., 2010), e sendo uma ferramenta rápida e de baixo custo, seu uso poderia ser uma estratégia diagnóstica para monitoramento dos rebanhos. Assim, o objetivo do estudo foi relacionar o escore de enchimento ruminal com os diferentes indicadores sanguíneos de saúde durante o período de transição.

Materiais e Métodos:

Animais e Manejo

O experimento foi conduzido em uma leiteria comercial no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O rebanho estava constituído de 600 vacas Holandesas em ordenha, com produção média de 8.500 litros/vaca/ano. Para a realização do estudo, entre maio a agosto de 2015, foram utilizadas 113 vacas multíparas.

As vacas ao completarem a 3ª semana da data prevista do parto foram alocadas em um potreiro com baixa oferta de forragem, onde permaneceram até o dia do parto. Neste potreiro receberam 100% do seu requerimento nutricional (NRC, 2001) fornecida mediante uma ração totalmente misturada (TMR) acrescida de sais aniônicos, ofertada duas vezes ao dia (8:00 e 16:30 horas). Após o parto, as vacas foram alocadas em um *compost barn* com cochos coletivos onde permaneceram até o 3º dia de lactação. No dia do parto todas as vacas receberam 300 mL de propilenoglicol e 250 g de propionato de cálcio misturados em 1 L de água por via oral, além de 40 g de gliconato de cálcio por via subcutânea. No 2º dia receberam 20 g de gliconato de cálcio por via subcutânea. Nesse período as mesmas foram ordenhas duas vezes ao dia e receberam três vezes ao dia (5:30, 10:00 e 15:00 horas) a TMR calculada para atender o requerimento da categoria (Tabela 1). Após o 3º dia de lactação as vacas foram

alocadas e manejadas em um *free-stall*, onde receberam a mesma dieta das vacas recém-paridas, porém foram ordenhadas três vezes ao dia.

Tabela 1. Tabela com ingredientes e composição nutricional da dieta pré e pós-parto com base na matéria seca.

Item	Dieta	
	Pré-parto	Pós-parto
Ingredientes %		
Silagem de milho	57	29
Pré secado azevém	-	11
Feno de aveia/azevém	20	3
Milho moído fino	-	21
Casca de soja	-	18
Farelo de soja	10	16
Farelo de trigo	10	-
Suplemento mineral pré-parto	3	-
Suplemento mineral pós-parto	-	2
Composição Nutricional:		
Matéria Seca %	39,84	56,35
Proteína Bruta %	12,8	15,2
FDN %	51,8	39,8
CNF %	26,7	37,3
Amido %	16,1	23,7
Extrato Etéreo %	3,8	3,4
Energia Líquida Mcal/kg MS	1,47	1,67
DCAD meq/kg	-50	100
Ca %	0,63	0,63
P %	0,44	0,37
Mg %	0,35	0,21
K %	1,27	1,20
S %	0,32	0,22
Na %	0,10	0,16
Cl %	0,74	0,43

Delineamento experimental

Utilizou-se um modelo experimental de coorte, com amostragens semanais desde a 2^a semana pré-parto até a 3^a semana pós-parto, de forma a considerar ao menos uma semana de adaptação a dieta pré-parto. As amostragens foram realizadas às 4:00 am no pré-parto, e 7:00 am no pós-parto. Além das amostragens semanais, também realizou-se uma amostragem de cada vaca até 12 horas após o parto.

Os dados aferidos no estudo foram o escore de enchimento ruminal (Zaaijer and Noordhuizen, 2003), escore de condição corporal (1- animal caquético, 5 animal obeso) (Ferguson et al., 1994). De forma pareada a estas aferições foram coletadas amostras de 5 mL de sangue heparinizado, o qual foi centrifugado (800 x g) para obtenção de plasma.

Tabela 2. Critérios utilizados para classificar o escore de enchimento ruminal (ERR).

EER	Descrição
1	A prega sob as vértebras lombares se curvava para dentro. A prega de pele sobre o ílio descia verticalmente. O vazio atrás da última costela era mais profundo que a largura de uma mão.
2	A pele sob as vértebras lombares se curvava para dentro. A prega de pele sobre o ílio se dirigia diagonalmente para frente em direção à última costela. Observava-se um espaço vazio atrás da última costela com profundidade da largura de uma mão.
3	A pele sob as vértebras lombares descia verticalmente com a largura de uma mão e então se curvava para fora. A prega de pele sobre o ílio não é visível. O flanco atrás da última costela ainda era visível.
4	A pele sob as vértebras se curvava para fora. O espaço do flanco não era visível atrás da última costela.
5	As vértebras lombares não eram muito visíveis, não havia transição visível entre flanco e as costelas.

(Adptado de Zaaijer e Noordhuizen, 2003)

As amostras de plasma foram congeladas a -20 °C em microtubos tipo *ependorf*. Nas amostras de plasma foram determinadas as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (NEFA; WAKO, NEFA-C, WAKO PureChemical Industries, Osaka, Japan), β OH- butirato (BHBA; Randox, D-3-Hydroxybutyrate, Ranbut), colesterol (Wiener, Colestat enzimático AA liq) e cálcio (Ca-color Arsenazo III, Wiener), por espectrofotometria em um analisador automático (VitalabSelectra II).

Análise estatística

A análise de dados foi realizada separadamente para o período pré-parto, parto e pós-parto. Devido a baixa ocorrência do EER 4 (n=3), para fins estatísticos esta escala foi incluída junto com EER 3. Para verificar as diferenças entre as concentrações dos indicadores metabólicos de saúde os dados foram submetidos a uma análise de variância, considerando como variáveis dependentes, o escore de condição corporal, concentrações de cálcio, NEFA, BHBA e colesterol. E como variáveis independentes incluiu-se a semana de lactação, escore de enchimento ruminal, assim como sua interação. As diferenças entre médias foram contrastadas pelo teste de Tukey.

A associação entre o escore de enchimento ruminal com as concentrações dos indicadores sanguíneos de saúde foi avaliada mediante correlação de Spearman, utilizando modelos separados para as semanas (-2, -1, parto, +1, +2 e +3). O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$, utilizando o programa IBM SPSS Statistics 19.

Resultados

Pré-parto

Vacas com EER3 no período pré-parto apresentaram maiores concentrações de colesterol, cálcio, BHBA e maiores médias escore de condição corporal que as com EER 1 ($P < 0,05$; Tabela 2). Já as vacas com EER 2 apresentaram valores similares com o EER 1, exceto para a colesterolemia, na qual apresentaram valores intermediários ao EER 1 e EER3. Entretanto, as concentrações de NEFA foram similares entre os 3 escores de enchimento ruminal ($P > 0,05$, Tabela 3). Também se observou que a colesterolemia foi maior na segunda semana pré-parto comparada com a primeira semana pré-parto ($P < 0,05$). Porém, as concentrações de NEFA, BHBA, cálcio e o ECC permaneceram similares durante as semanas do pré-parto ($P > 0,05$).

Na análise de associação indicou uma correlação positiva entre o EER e as concentrações plasmáticas de colesterol, cálcio e β OH butirato, assim como com a condição corporal na segunda semana pré-parto ($P < 0,05$, Tabela 6). Entretanto, na primeira semana pré-parto somente BHBA e condição corporal apresentaram associação positiva com o EER ($P < 0,05$).

Tabela 3. Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores sanguíneos e do escore de condição corporal (ECC) (média \pm EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de vacas durante o período de transição pré-parto.

Indicador	Escore de enchimento ruminal			Semana		P		
	EER 1	EER2	EER3	-2	-1	EER	Sem	EERxSem [#]
NEFA	0,32 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,099	0,261	0,276
BHB	0,31 \pm 0,03b	0,38 \pm 0,01b	0,48 \pm 0,01a	0,38 \pm 0,02	0,41 \pm 0,02	0,000	0,288	0,466
Colesterol	2,21 \pm 0,12b	2,31 \pm 0,07ab	2,52 \pm 0,06a	2,45 \pm 0,08a	2,24 \pm 0,06b	0,020	0,044	0,058
Cálcio	2,27 \pm 0,04b	2,31 \pm 0,02b	2,38 \pm 0,02a	2,30 \pm 0,02	2,33 \pm 0,02	0,004	0,384	0,288
ECC	2,68 \pm 0,05b	2,81 \pm 0,03b	2,97 \pm 0,03a	2,79 \pm 0,03	2,85 \pm 0,03	0,000	0,247	0,660
N	25	73	98	94	102	-	-	-

Interação entre escore de enchimento ruminal e semana pré-parto.

^{a, b} diferenças entre escores de enchimento ruminal pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

Parto

Na data do parto as vacas com EER3 e EER2 apresentaram maior ECC que as com EER1 ($P < 0,05$). Entretanto, as concentrações plasmáticas médias dos indicadores sanguíneos foram similares nos diferentes EER ($P > 0,05$, Tabela 4). Por outro lado, a análise de associação demonstrou o EER associou-se negativamente com NEFA e positivamente com a condição corporal ($P < 0,05$, Tabela 6).

Tabela 4. Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores sanguíneos e do escore de condição corporal (ECC) (média \pm EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de vacas no dia do parto.

Indicador	Escore de enchimento ruminal			P
	EER 1	EER2	EER3	EER
NEFA	0,66 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03	0,55 \pm 0,08	0,441
BHB	0,32 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	0,31 \pm 0,04	0,924
Colesterol	1,90 \pm 0,05	1,96 \pm 0,05	1,89 \pm 0,11	0,732
Cálcio	2,09 \pm 0,05	2,05 \pm 0,03	2,05 \pm 0,09	0,810
ECC	2,69 \pm 0,05b	2,90 \pm 0,03a	2,97 \pm 0,07a	0,000
n	33	66	12	-

^{a, b} diferenças entre os diferentes escores de enchimento ruminal pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

Pós-parto

Vacas com EER3 apresentaram menores concentrações plasmáticas de NEFA, maior colesterolemia e maior escore de condição corporal que vacas com EER1. As vacas com o EER2 apresentaram concentrações plasmáticas de NEFA e de colesterol intermediárias, porém similares aos EER1 e EER 3 ($P > 0,05$). Por outro lado, a condição corporal do EER2 foi superior ao EER1 ($P < 0,05$) e similar ao EER3 ($P > 0,05$; Tabela 5).

Também, observou-se que as concentrações plasmáticas de NEFA, colesterol e cálcio variaram com o avançar das semanas pós-parto. Sendo que as concentrações de NEFA diminuíram ($P < 0,05$) na terceira semana pós-parto quando comparadas com a primeira e segunda semana, as quais foram similares entre si ($P > 0,05$). Um comportamento inverso, foi observado na calcemia, a qual aumentou a partir da segunda semana pós-parto em relação a primeira ($P < 0,05$), mantendo-se com valores similares a terceira semana ($P > 0,05$). Já, a colesterolemia aumentou gradativamente com o avançar das semanas pós-parto, com valores inferiores na primeira semana, intermediários na segunda semana e superiores na terceira semana pós-parto ($P < 0,05$; Tabela 5).

A análise de correlação demonstrou que o EER associou-se negativamente com as concentrações plasmáticas de NEFA na primeira semana pós-parto, e positivamente com a colesterolemia na segunda semana pós-parto ($P < 0,05$). Similar ao observado no pré-parto e no dia do parto, o EER associou-se positivamente com a condição corporal durante as três semanas pós-parto ($P < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 5. Concentrações plasmáticas (mmol/L) de indicadores de saúde e do escore de condição corporal (ECC) (média \pm EPM) em diferentes escores de enchimento ruminal (EER) de multíparas durante o período de transição pós-parto.

Indicador	Escore de enchimento ruminal			Semana			P		
	EER 1	EER2	EER3	1°	2°	3°	EER	Sem	EERxSem [#]
NEFA	0,69 $\pm 0,03a$	0,66 $\pm 0,02ab$	0,55 $\pm 0,03b$	0,68 $\pm 0,03a$	0,67 $\pm 0,03a$	0,56 $\pm 0,03b$	0,012	0,007	0,592
BHB	0,43 $\pm 0,02$	0,44 $\pm 0,01$	0,46 $\pm 0,01$	0,47 $\pm 0,02$	0,40 $1 \pm 0,02$	0,45 $\pm 0,02$	0,626	0,101	0,200
Colesterol	2,68 $\pm 0,07b$	2,80 $\pm 0,05ab$	2,98 $\pm 0,09a$	2,46 $\pm 0,07c$	2,82 $\pm 0,07b$	3,18 $\pm 0,07a$	0,045	0,000	0,799
Cálcio	2,27 $\pm 0,02$	2,26 $\pm 0,01$	2,27 $\pm 0,02$	2,22 $\pm 0,02b$	2,27 $\pm 0,02a$	2,31 $\pm 0,02a$	0,879	0,031	0,286
ECC	2,60 $\pm 0,03b$	2,76 $\pm 0,02a$	2,80 $\pm 0,03a$	2,76 $\pm 0,03$	2,73 $\pm 0,02$	2,67 $\pm 0,26$	0,000	0,054	0,268
n	83	184	60	109	112	106	-	-	-

#Interação entre o escore de enchimento ruminal e a semana pré-parto.

^{a, b, c} indicam diferenças entre os escores de enchimento ruminal pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

Tabela 6. Valores da correlação de Spearman (ρ) do escore de enchimento ruminal e indicadores sanguíneos durante o período de transição (-3 a + 3 semana em relação ao parto) em vacas multíparas.

	Semana	Colesterol		Cálcio		BHBA		NEFA		ECC	
Multíparas, n=113	-2	0,49	0,013	0,54	0,003	0,62	0,001	-0,35	0,214	0,61	0,000
	-1	0,37	0,153	0,38	0,147	0,56	0,001	-0,33	0,266	0,60	0,000
	Parto	0,18	0,746	-0,16	0,802	0,08	0,937	-0,44	0,045	0,62	0,000
	1	0,30	0,360	0,35	0,210	-0,48	0,809	-0,55	0,001	0,61	0,000
	2	0,48	0,016	-0,24	0,534	0,37	0,162	-0,34	0,226	0,46	0,027
	3	0,19	0,712	0,08	0,949	0,21	0,654	-0,41	0,079	0,57	0,001

BHBA: β OH butirato; NEFA: ácidos graxos não esterificados; ECC: escore de condição corporal.

Discussão

Os resultados demonstraram que o EER associou-se com os indicadores sanguíneos de saúde durante o período de transição, assim como com o escore de condição corporal. A principal associação do EER deu-se com a condição corporal, a qual se manteve desde a segunda semana pré-parto até a terceira semana pós-parto.

Tendo em vista que tanto o EER como o ECC são escores visuais, e que ambos tomam por base a observação de estruturas ósseas coincidentes, como são os processos transversos das vértebras, parte da associação encontrada poderia dar-se pela deposição de massa muscular e gordura subcutânea que levam a um maior enchimento da região do flanco (Hulsen e Driessen). Entretanto, outro estudo não observou associação entre o EER e ECC no pré-parto de vacas multíparas (Kawashima et al., 2016). Por outro lado, não se pode descartar que vacas com maior EER tendem a consumir mais alimento e por este motivo, apresentam um maior ECC. Entretanto devemos considerar que o EER é um parâmetro que varia ao longo do dia em dependência do consumo de matéria seca e da taxa de passagem (Burfeind et al., 2010). Enquanto o ECC é mais constante no tempo, diminuindo ou aumentando de forma mais gradativa de acordo com o balanço energético do animal (Roche et al., 2013b).

Referente aos indicadores sanguíneos observou-se uma melhor associação com o EER durante o período pré-parto. Neste período aquelas vacas com maiores EER apresentam maiores concentrações plasmáticas de colesterol, cálcio, e BHBA ($P < 0,05$). Já no dia do parto não se observou associação com estes indicadores, porém sim foi identificada uma associação negativa com as concentrações plasmáticas de NEFA. Similar, no pós-parto manteve-se a associação com NEFA apenas até a primeira semana, e com o colesterol foi observado uma associação na segunda semana pós-parto. Desta forma, aquelas vacas com maiores EER apresentaram menores concentrações de NEFA e maiores colesterolemias no pós-parto. Um estudo realizado com vacas leiteiras no pré-parto também demonstrou uma associação positiva entre a colesterolemia e o EER nas duas semanas prévias ao parto (Kawashima et al., 2016). A associação positiva entre a colesterolemia e o EER poderia estar relacionada com a ingestão de matéria seca. Um estudo de validação do EER demonstrou que 46% do EER se explica pela ingestão de matéria seca ($r=0,68$) (Burfeind et al., 2010).

Por outro lado, um estudo realizado com vacas leiteiras durante o período de transição demonstrou que a colesterolemia mimetizou a curva de ingestão de matéria seca (Guretzky et al., 2006). Estes resultados podem ser corroborados com o fato da colesterolemia ter reduzido

a medida que se aproximou do parto, e ter aumentado gradativamente com o avanço do pós-parto, conforme comportamento da curva de ingestão de matéria seca de vacas leiterias (Grummer et al., 2004).

O outro indicador sanguíneo que se associou com o EER pré-parto, e que também estaria relacionado com a ingestão de matéria seca, seria o BHBA. Apesar, do BHBA ser um indicador de balanço energético negativo, originado da beta-oxidação do NEFA, ele também tem origem na parede ruminal proveniente do butirato pré-ingerido ou produzido através da fermentação ruminal (Kaneco et al., 2008). Vários estudos indicam que o BHBA seria um indicador de balanço energético negativo no pós-parto, entretanto não apresenta valor diagnóstico no pré-parto. Pois neste período, a vaca não estaria capacitada para realizar a beta-oxidação (Roche et al., 2013a). Inclusive no pós-parto, onde a vaca apresenta uma adequada capacidade cetogênica, se observa uma baixa associação entre BHBA e NEFA ($r=0,26$) (McCarthy et al., 2015) indicando que existem fatores não associados à mobilização lipídica que interferem nas concentrações plasmáticas de BHBA. Desse modo, podemos inferir que a correlação positiva do BHBA com o EER nas duas semanas do pré-parto estaria mais bem associada a taxa de fermentação ruminal, que a um balanço energético negativo, especialmente devido ao fato das concentrações encontrarem-se dentro dos intervalos fisiológicos (Mulligan et al., 2006).

Estudos de comportamento ingestivo em vacas de média produção em lactação avançada demonstraram que as concentrações plasmáticas de BHBA aumentaram ao longo do dia associado ao maior consumo de alimento, alcançando inclusive valores compatíveis com cetose subclínica (Noro et al., 2011). Estes achados indicam que o BHBA não seria um bom preditor do balanço energético do animal, pois é sensível a taxa de fermentação ruminal.

Por outro lado, as menores concentrações de NEFA encontradas no EER3 durante o pós-parto estaria indicando uma menor lipomobilização quando comparadas aquelas a vacas com EER1. Entretanto cabe ressaltar que as médias das concentrações plasmáticas de NEFA, inclusive nas vacas com EER1, se encontraram abaixo do limite referencial, indicando que os animais estavam com seus requerimentos energéticos cobertos. Em situações nas quais o ingresso energético é inferior ao requerimento das vacas se observa uma excessiva lipomobilização que é manifestada por um aumento das concentrações de NEFA circulante em desmedro das suas reservas corporais (LeBlanc, 2010). Deste modo, apesar de observarem-se diferenças nas concentrações de NEFA entre EER no pós-parto, pode-se inferir que as vacas apresentaram

uma redução do consumo considerada fisiológico para este período, que não impactou negativamente sobre o balanço energético das mesmas.

Já o cálcio apresentou diferenças entre EER apenas durante no pré-parto, com um comportamento similar ao observado para o BHBA. Apesar dos estudos associados a homeostase do Ca^{2+} indicarem que a calcemia depende da mobilização óssea, a absorção intestinal ativa também afeta suas concentrações (Goff, 1999). A absorção do cálcio é dependente do estatus da vitamina D3, assim como de sua biodisponibilidade a nível intestinal (Roche et al., 2013a). Alguns estudos indicam que a calcemia está associada à contração da musculatura lisa do trato gastrointestinal. No nosso estudo vimos que vacas com menores EER apresentaram menor calcemia, entretanto não se pode inferir se esta associação é de causa ou efeito. Pois a menor calcemia poderia ter contribuído para uma menor ingestão de matéria seca, ou mais bem a menor ingestão de matéria seca poderia ter associado a um menor ingresso de cálcio e de vitamina D3 proveniente da dieta, o que poderia ter gerado uma menor absorção intestinal. A associação do consumo de matéria seca com a calcemia foi demonstrada num trabalho realizado com vacas leiteiras onde aquelas que apresentaram menor consumo de matéria seca nas duas semanas pré-parto cursavam com hipocalcemia pós-parto (Jawor et al., 2012).

Conclusão

Portanto vacas com maior escore de enchimento ruminal pré-parto cursaram com um melhor estatus energético e cálcio. Da mesma forma vacas com EER3 pós-parto apresentaram melhor balance energético que aquelas com EER1.

A associação observada entre o EER e os indicadores energéticos e a calcemia especialmente no pré-parto indicam que o EER pode ser utilizado como uma ferramenta de monitoramento da saúde do rebanho. Este trabalho abre antecedentes para que futuros estudos sejam realizados com o objetivo de validar o EER como preditor de saúde nos rebanhos leiteiros.

Referências

Bradford, B. J., K. Yuan, J. K. Farney, L. K. Mamedova, and A. J. Carpenter. 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci* 98(10):6631-6650.

Burfeind, O., P. Sepulveda, M. A. von Keyserlingk, D. M. Weary, D. M. Veira, and W. Heuwieser. 2010. Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. *J Dairy Sci* 93(8):3635-3640.

Espadamala, A., P. Pallares, A. Lago, and N. Silva-Del-Rio. 2016. Fresh-cow handling practices and methods for identification of health disorders on 45 dairy farms in California. *J Dairy Sci* 99(11):9319-9333.

Ferguson, J. D., D. T. Galligan, and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci* 77(9):2695-2703.

Goff, J., P. . 1999. Dry Cow Nutrition and Metabolic Disease in Parturient Cows. *Advances in Dairy Technology* 11:63-79.

Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20(3):447-470.

Guretzky, N. A., D. B. Carlson, J. E. Garrett, and J. K. Drackley. 2006. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *J Dairy Sci* 89(1):188-200.

Hulsen, J. and J. Driessen. 2016. Cow Signals

Jawor, P. E., J. M. Huzzey, S. J. LeBlanc, and M. A. von Keyserlingk. 2012. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *J Dairy Sci* 95(3):1240-1248.

Kaneco, J., J. Harvey, and M. Bruss. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. Vol. 4. 6th ed. ed. Lipids and Ketone. Elsevier Inc., San Diego, California. USA.

Kawashima, C., C. Karaki, M. Munakata, M. Matsui, T. Shimizu, A. Miyamoto, and K. Kida. 2016. Association of rumen fill score and energy status during the close-up dry period with conception at first artificial insemination in dairy cows. *Anim Sci J* 87(10):1218-1224.

LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev* 56 Suppl:S29-35.

Martinez, N., C. A. Risco, F. S. Lima, R. S. Bisinotto, L. F. Greco, E. S. Ribeiro, F. Maunsell, K. Galvao, and J. E. Santos. 2012. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95(12):7158-7172.

McArt, J. A., D. V. Nydam, and G. R. Oetzel. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci* 95(9):5056-5066.

McCarthy, M. M., S. Mann, D. V. Nydam, T. R. Overton, and J. A. McArt. 2015. Short communication: concentrations of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *J Dairy Sci* 98(9):6284-6290.

- Mulligan, F. J., L. O'Grady, D. A. Rice, and M. L. Doherty. 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim Reprod Sci* 96(3-4):331-353.
- Noro, M., J. Borkert, G. A. Hinostroza, R. Pulido, and F. Wittwer. 2011. Variaciones diarias de metabolitos sanguíneos y su relación con el comportamiento alimenticio en vacas lecheras a pastoreo primaveral. *Revista Científica, FCV-LUZ* 21:125 - 130,.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci* 93(2):546-554.
- Roche, J. R., A. W. Bell, T. R. Overton, and J. J. Looor. 2013a. Nutritional management of the transition cow in the 21st century – a paradigm shift in thinking. *Animal Production Science*.
- Roche, J. R., K. A. Macdonald, K. E. Schutz, L. R. Matthews, G. A. Verkerk, S. Meier, J. J. Looor, A. R. Rogers, J. McGowan, S. R. Morgan, S. Taukiri, and J. R. Webster. 2013b. Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 96(9):5811-5825.
- Sepulveda-Varas, P., D. M. Weary, M. Noro, and M. A. von Keyserlingk. 2015. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLoS One* 10(3):e0122317.
- Zaaijer, D. and J. P. Noordhuizen. 2003. A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows. *Ir. Vet. J.* (56):145–151.

3.2 ARTIGO 2

Escore de enchimento ruminal pré-parto como preditor de saúde e retorno a ciclicidade em vacas leiteiras

O. B. Meotti*, C. P. Batista†, R. Gretel‡ e M. Noro*¹

* Hospital Veterinário, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

† Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

‡ Laboratório de Técnicas Nucleares, Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade da Republica do Uruguai, Montevideú, Uruguai.

Resumo

Durante o período de transição a vaca passa por várias alterações metabólicas necessárias para atender a demanda gerada pela produção do colostro, crescimento fetal, lactação precoce e involução uterina. Mas nesse período a vaca tem uma ingestão de matéria seca insuficiente para atender essas demandas passando assim por um balanço energético negativo. Dessa forma esse é um período crítico para a vida produtiva da vaca. Pois essas adaptações metabólicas geram distúrbios na imunidade, fazendo com que essa fase seja a de maior incidência de doenças durante a vida produtiva das vacas leiteiras. Tendo em vista que vacas que apresentam enfermidades tem alterações prévias no seu consumo de matéria seca, se faz necessário validar ferramentas práticas para monitorar a saúde do rebanho. E dessa forma diminuir as perdas produtivas e aumentar o bem estar animal. O estudo objetivou validar o escore de enchimento ruminal (EER) como preditor pré-parto da ocorrência de doenças e taxa de retorno a ciclicidade em vacas leiteiras. Para isso foi realizado um estudo de coorte onde foram acompanhadas 113 vacas multíparas durante o período de transição. Mensurou-se o EER (1 a 5) as -2 e -1 semanas pré-parto e no dia do parto. No pós-parto as vacas foram monitoradas diariamente para o diagnóstico de doenças, e coletou-se sangue entre 4º e 8º semana de lactação para determinar o regresso a ciclicidade. Para análise estatística o escore de enchimento ruminal foi a variável preditora e o evento a doença. De modo que os animais foram divididos de acordo com apresentação da doença clínico e o grupo controle foi composto por vacas que não cursaram com doença clínica. Avaliou-se o valor diagnóstico do

EER para prever a ocorrência das doenças clínicas mais prevalentes (metrite, mastite, retenção placentária, deslocamento de abomaso e afecções podais) mediante curva ROC. Quando a curva ROC foi significativa ($P < 0,05$) determinou-se o risco relativo para a doença através do índice de Youden. Por fim a avaliação de retorno a ciclicidade foi realizada mediante análise de Kaplan-Meier. O EER na semana -2 pré-parto apresentou bom valor preditor para todas as enfermidades, com ponto de corte $EER \leq 2$, com Se variando entre 53% para metrite, 55% para retenção placentária, 60% para mastite, 66,7% para deslocamento de abomaso e 75% para afecções podais, e uma Es de 80% para todas as doenças. Na semana -1 pré-parto e na data do parto o EER apresentou valor diagnóstico apenas para afecções podais, com um ponto de corte de $EER \leq 1$. Já para retorno a ciclicidade as vacas multíparas que apresentaram $EER \leq 1$ nos três períodos analisados voltaram mais tardiamente e em menor porcentagem a ciclicidade quando comparados com $EER \leq 3$. Portanto o EER na semana -2 pré-parto foi uma boa ferramenta preditora de doenças em vacas multíparas, assim como baixos escores de enchimento ruminal durante o período pré-parto foram associados a baixas taxas de regresso a ciclicidade.

Palavras chave:

Monitoramento; Doença clínica; Escore visual; Monitoramento

Introdução

O período de transição é crítico para vida da vaca leiteira, pois ela passa de um de estado gestante a um lactante, acompanhada de diversas mudanças endócrinas e metabólicas. Este período é o de maior ocorrência de doenças na vida produtiva da vaca leiteira (Bradford et al., 2015), com incidência variando de 56 a 75% (Le Blanc et al., 2006, Sepulveda-Varas et al., 2015). Além da alta incidência de doenças neste período, as vacas enfermas diminuem sua produção leiteira e eficiência reprodutiva, culminando em um desastre econômico e de bem-estar animal (Seifi et al., 2011).

Dessa forma se faz necessário monitorar o rebanho, para diagnosticar precocemente a ocorrência das enfermidades, visando minimizar as perdas econômicas e aumentar o bem estar (Espadamala et al., 2016). Com o objetivo de monitorar a saúde e bem estar do rebanho, alguns pesquisadores elaboraram e indicaram à aplicação de protocolos de monitoramento populacional utilizando diversas ferramentas diagnósticas (Lukas et al., 2015). Entre as

ferramentas mais pesquisadas, estão a mensuração dos metabólicos sanguíneos indicadores de balanço energético como os ácidos graxos não esterificados (NEFA) e o β -hidroxi-butilato (BHBA), a aferição da descarga vaginal e o escore de condição corporal (Le Blanc et al., 2006). Também indicam a mensuração da calcemia para prever o risco da vaca desenvolver metrite (Martinez et al., 2012).

Outros pesquisadores avaliaram o comportamento ingestivo das vacas como indicador mais precoce da ocorrência de doenças durante o período de transição (Huzzey et al., 2007, Gonzalez et al., 2008, Norring et al., 2014). Referente ao comportamento ingestivo, observou-se que vacas que desenvolveram metrite apresentaram menor consumo de matéria seca uma semana antes do pré-parto, comparadas com vacas saudáveis (Huzzey et al., 2007). Similar, vacas que desenvolveram cetose subclínica no pós-parto, apresentaram menor consumo uma semana antes do parto, do que vacas sem cetose (Goldhawk et al., 2009). É importante ressaltar que os estudos citados acima avaliaram a ingestão de matéria seca (IMS) mediante um sistema eletrônico, que mensura a quantidade de alimento ingerido, número de visitas ao cocho, tempo de permanência no cocho e quantidade de alimento consumido por minuto. Entretanto seu uso é limitado devido ao alto custo destes equipamentos de mensuração (Weary et al., 2009).

Tendo em vista que o monitoramento da IMS se mostrou uma ferramenta de diagnóstico, porém como os custos de aquisição de equipamentos para mensura-la impossibilitam sua aplicação em alguns sistemas produtivos, se faz necessário contar com outras ferramentas de diagnóstico. Entre as ferramentas de monitoramento de rebanho de baixo custo poderiam incluir-se os escores visuais (Espadamala et al., 2016). Entre eles, o escore de enchimento ruminal apresenta uma boa correlação com a quantidade de alimento ingerido pela vaca (Burfeind et al., 2010), entretanto ainda não foi avaliado como preditor de saúde em vacas leiteiras.

Assim, o objetivo do presente estudo foi validar o escore de enchimento ruminal pré-parto como preditor de saúde em vacas leiteiras durante o período de transição, entregando pontos de corte para as principais doenças que afetam as vacas neste período, assim como avaliar sua associação com a taxa de retorno a ciclicidade.

Material e Métodos

Animais e manejo

O experimento foi realizado em uma leiteria comercial no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com 600 vacas Holandesas em lactação, com produção média de 8.500 litros/vaca/ano. No período de maio a agosto de 2015, selecionaram-se as vacas em período seco, para conduzir o estudo, sendo amostradas 113 vacas multíparas.

As vacas no período seco foram manejadas em áreas de tifton 85 (*Cynodon spp*) ou aveia consorciada com azevém (*Lolium multiflorum*) dependendo do mês de parição. A partir da 3ª semana da data prevista do parto as mesmas foram alocadas em um potreiro com baixa oferta de forragem (<7 kg MS/vaca/dia), onde recebiam em cochos coletivos 100% do seu requerimento nutricional (NRC, 2001) por meio de dieta totalmente misturada (TMR) acrescida de sais aniônicos, ofertada duas vezes ao dia (8:00 e 16:30 horas). Os componentes da dieta estão expostos na tabela 1.

Após o parto, as vacas paridas foram alocadas em um *compost barn* onde permaneceram até o 3º dia pós-parto. No dia do parto as vacas foram tratadas com 300 mL de propilenoglicol e 250 g de propionato de cálcio, diluídos em 1 L de água *per os*, além de 40g de gliconato de cálcio por via subcutânea. No 2º dia receberam 20 g de gliconato de cálcio por via subcutânea. Até o 3º dia após o parto as vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (7:00 e 18:00 horas) e submetidas a um exame clínico diário, para identificação precoce de alterações clínicas (8:00 horas). Após o 3º dia as vacas foram manejadas em um *free-stall*, onde permaneceram durante o período de transição pós-parto. Neste período, as vacas foram submetidas a um exame clínico diário após uma das três ordenhas diárias (5:30, 10:00, 15:00 horas), visando identificação de doenças clínicas.

No pós-parto as vacas foram alimentadas com TMR calculada para cumprir com os requerimentos da categoria ofertada duas vezes ao dia em cochos coletivos no *compost barn* (8:30 e 17:00 horas) e três vezes na linha de alimentação do *free-stall* (6:00, 10:00 e 15:00 horas).

Tabela 1. Tabela com ingredientes e composição nutricional da dieta pré e pós-parto com base na matéria seca.

Item	Dieta	
	Pré-parto	Pós-parto
Ingredientes %		
Silagem de milho	57	29
Pré secado azevém	-	11
Feno de aveia/azevém	20	3
Milho moído fino	-	21
Casca de soja	-	18
Farelo de soja	10	16
Farelo de trigo	10	-
Suplemento mineral pré-parto	3	-
Suplemento mineral pós-parto	-	2
Composição Nutricional:		
Matéria Seca %	39,84	56,35
Proteína Bruta %	12,8	15,2
FDN %	51,8	39,8
CNF %	26,7	37,3
Amido %	16,1	23,7
Extrato Etéreo %	3,8	3,4
Energia Líquida Mcal/kg MS	1,47	1,67
DCAD meq/kg	-50	100
Ca %	0,63	0,63
P %	0,44	0,37
Mg %	0,35	0,21
K %	1,27	1,2
S %	0,32	0,22
Na %	0,10	0,16
Cl %	0,74	0,43

Delineamento experimental

O modelo experimental utilizado foi um coorte com seguimento semanal para enfermidades, realizado desde a -2 semana pré-parto até a 3 semana pós-parto, ademais de uma amostragem realizada até as 12 horas do dia do parto. Para inclusão no estudo, considerou-se vacas adaptadas ao manejo pré-parto, estando ao menos uma semana consumindo a dieta pré-parto. Para determinar a taxa de retorno a ciclicidade realizou-se seguimento semanal da 4^a até a 8^a semana pós-parto.

Durante o período de seguimento, realizaram-se aferições do escore de enchimento ruminal conforme demonstrado na tabela 2 (Zaaijer and Noordhuizen, 2003). As observações foram

realizadas semanalmente nas duas semanas prévias a data prevista do parto às 05.00 horas, e uma última realizada até às 12 horas do parto. As vacas foram monitoradas diariamente, para o diagnóstico de enfermidades clínicas, e semanalmente pareadas ao escore de enchimento ruminal para o diagnóstico de metrite e afecções podais. Para fins estatísticos os grupos foram separados de acordo com as doenças que apresentaram durante o período de transição.

Tabela 2. Critérios utilizados para classificar os diferentes escores de enchimento ruminal (Zaaijer e Noordhuizen, 2003).

EER	Descrição
1	A prega sob as vértebras lombares se curvava para dentro. A prega de pele sobre o ílio descia verticalmente. O vazio atrás da última costela era mais profundo que a largura de uma mão.
2	A pele sob as vértebras lombares se curvava para dentro. A prega de pele sobre o ílio se dirigia diagonalmente para frente em direção à última costela. Observava-se um espaço vazio atrás da última costela com profundidade da largura de uma mão.
3	A pele sob as vértebras lombares descia verticalmente com a largura de uma mão e então se curvava para fora. A prega de pele sobre o ílio não é visível. O flanco atrás da última costela ainda era visível.
4	A pele sob as vértebras se curvava para fora. O espaço do flanco não era visível atrás da última costela.
5	As vértebras lombares não eram muito visíveis, não havia transição visível entre flanco e as costelas.

Definição e diagnóstico das doenças

O diagnóstico das doenças foi estabelecido por um médico veterinário seguindo os critérios expostos a seguir: *hipocalcemia clínica*, quando o animal cursou com sinais nervosos característicos da doença, e respondeu a terapia com cálcio endovenoso; *retenção placentária*, quando os anexos fetais ficaram retidos por mais de 12 horas após o parto; *cetose clínica*, quando a vaca apresentou queda na produção leiteira e odor cetônico na expiração; *mastite*, quando a vaca apresentou alteração no leite e edema no mesmo quarto mamário e/ou alterações sistêmicas; *deslocamento de abomaso*, quando na percussão abdominal auscultou-se som metálico. O diagnóstico *metrite* foi realizado semanalmente até a 3ª semana pós-parto mediante a técnica da mão enluvada. Considerou-se vacas com metrite aquelas com descarga vaginal acima de 3 na escala de 0-4 pelo menos em uma das três semanas amostradas (Huzzey et al., 2007). Também, realizou-se diariamente um exame clínico naquelas vacas que baixaram a produção láctea diária, para diagnóstico de outros transtornos clínicos. Por último o diagnóstico das *afecções podais* foi realizado semanalmente através do escore de locomoção, numa escala entre 1 a 5 (Bicalho et al., 2007), onde o animal com grau 1 não

apresenta alteração na marcha e o animal grau 5 está extremamente claudicante, sem apoiar o membro. Considerou-se vacas com afecções podais aquelas com escore de locomoção igual ou superior a 3.

Retorno a ciclicidade

Para avaliar o regresso a ciclicidade realizou-se amostragens de sangue heparinizado semanalmente entre 4^a até a 8^a semana pós-parto. O regresso a ciclicidade foi estabelecido quando a concentração de progesterona plasmática foi ≥ 1 ng/mL.

Análise estatística

A incidência das doenças foi determinada mediante tabela de contingência confeccionada com o software IBM SPSS statistics 19®. Já para a análise epidemiológica, a vaca foi considerada a unidade experimental, o escore de enchimento ruminal foi a variável preditora da ocorrência de doenças (hipocalcemia, retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso, afecções podais, cetose). O grupo controle de doenças foi estabelecido incluindo apenas as vacas sem doenças clínicas. Devido à baixa incidência de hipocalcemia puerperal (n=1) e não ocorrência de cetose clínica (n=0) essas doenças não foram analisadas.

Avaliou-se o valor diagnóstico do escore de enchimento ruminal para predizer a ocorrência de doenças clínicas mediante curva ROC. Para tal utilizou-se os dados de cada vaca considerando a respectiva semana pré-parto (-2 ou -1), ou o dia do parto. Quando a curva ROC foi significativa ($P < 0,05$), determinou-se o ponto de máxima sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para predizer o risco da ocorrência da doença, mediante índice de Youden. A avaliação do retorno a ciclicidade foi realizado mediante análise de Kaplan-Meier. As análises de curva ROC e Kaplan-Meier foram realizadas no programa MedCalc v16.8.4 e graficada mediante curva de sobrevivência com o programa GraphPad Prism version 5.

Resultados

Valor preditivo do escore de enchimento ruminal para diagnóstico das doenças do transição.

No estudo 75,1% das vacas apresentaram ao menos uma doença clínica durante o período de transição. A doença de maior incidência foi a metrite, seguida por mastite e retenção de placenta (Tabela 3).

Tabela 3. Incidência dos eventos clínicos em vacas multíparas durante o período de transição.

Doenças Clínicas	n	%
Sem eventos clínicos	27	23,9
Metrite	73	64,6
Mastite	23	20,4
Retenção Placentária	22	19,5
Deslocamento de abomaso	6	5,3
Afecções podais	5	4,4

O escore de enchimento ruminal pré-parto foi um preditor de enfermidades nas vacas. A análise da curva ROC indicou que na segunda semana pré-parto somente o $EER \leq 2$ foi significativo como preditor de doenças (Tabela 4). Na tabela 4, observamos que $EER \leq 2$ foi um bom indicador ($P < 0,05$; $AAC > 0,6$) da ocorrência de metrite, mastite, retenção placentária, deslocamento de abomaso e de afecções podais. Já na semana - 1 pré-parto e na data do parto o EER apresentou valor diagnóstico apenas para afecções podais, com um ponto de corte de $EER \leq 1$ com Se 60% de e Es de 96% uma semana antes do parto e Se 80% e Es de 70% na data do parto.

A análise de risco demonstrou que vacas com $EER \leq 2$ na semana -2 pré-parto apresentaram 4,51 vezes mais probabilidade de desenvolvem metrite, 3,0 mais risco de desenvolverem mastite, 3,33 mais risco de deslocarem o abomaso, 2,75 risco cursarem com retenção de placenta e 3,75 mais risco de apresentaram afecções podais (Tabela 4)

Tabela 4. Avaliação diagnóstica dos escores de enchimento ruminal na 2ª semana pré-parto como preditor doenças do período de transição.

Eventos Clínicos	Metrite	Retenção placentária	Mastite	Deslocamento de Abomaso	Afecções podais
Ponto de Corte	$EER \leq 2$	$EER \leq 2$	$EER \leq 2$	$EER \leq 2$	$EER \leq 2$
AAC	0,68	0,69	0,72	0,75	0,83
IC 95% AAC	0,57-0,77	0,53-0,81	0,56-0,84	0,56-0,88	0,64-0,94
P valor	<0,001	0,007	0,002	0,032	0,025
Se (%)	53	55	60	66,7	75
Es (%)	80	80	80	80	80
Risco Relativo (RR)	4,51	2,75	3,00	3,33	3,75
IC 95% RR	1,51 - 13,5	1,14 - 6,60	1,26 - 7,10	1,26 - 8,76	1,42 - 9,86
Valor de P	0,007	0,024	0,013	0,015	0,007

AAC: área abaixo da curva; Se: Sensibilidade; Es: Especificidade

índice de Youden

Impacto do EER sobre regresso a ciclicidade

O EER também foi um preditor do regresso a ciclicidade. Vacas que apresentaram EER2 e EER3 na 2ª semana pré-parto retornaram mais precocemente a ciclicidade, 12,4 e 17 dias respectivamente, que aquelas com EER1 ($P < 0,05$; Figura 1a; Tabela 5). Já na 1ª semana pré-parto, somente as vacas com EER3 retornaram mais precocemente a ciclicidade comparadas com as de EER1 ($P < 0,05$; Figura 1b, Tabela 6). Sendo que, as vacas com EER2 regressaram em intervalo intermediário, e similar aos outros escores ($P > 0,05$; tabela 5). O EER da data no parto não afetou a média de dias do regresso a ciclicidade (tabela 5). Entretanto, em todas as semanas analisadas observou-se que vacas com EER1 apresentaram uma menor taxa de regresso a ciclicidade que aquelas com EER3 (Tabela 5).

Tabela 5. Tempo (média em dias, IC 95%) e porcentagem de vacas que retornaram a ciclicidade dependendo do escore de enchimento ruminal apresentado na respectiva semana pré-parto.

		Semana		
	Variável	-2	-1	Parto
EER1	Dias	53,8 (48,0 - 57,6)	47 (41,1 - 53,0)	45 (39,5 - 50,5)
	% vacas	18	50	40
EER2	Dias	41,4 (37,9 - 44,9)	39,8 (36,1 - 43,5)	38 (35,2 - 40,7)
	% vacas	59	49	72
EER3	Dias	36,8 (33,5 - 40,2)	37,6 (34,3 - 40,9)	42,6 (38,7 - 46,6)
	% vacas	72	79	73
<i>P</i>		0,006	0,029	0,044

Obtidas através da análise de Kaplan Meier.

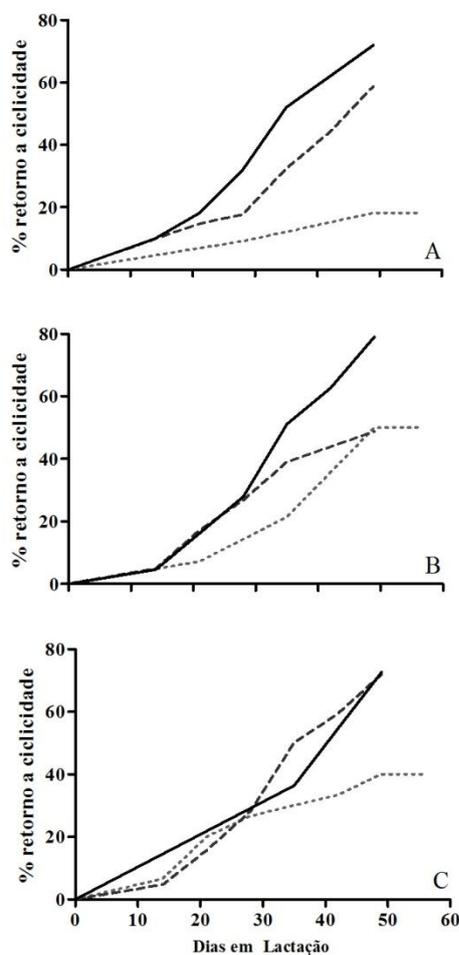


Figura 1. Retorno a ciclicidade de acordo com escore de enchimento ruminal (EER3 —; EER2 ---; EER1 ...) na A. -2 semana pré-parto, B. - 1 semana pré-parto e C. no dia do parto em vacas múltíparas.

Discussão

Devido à alta incidência de doenças no período de transição, se faz necessário o diagnóstico precoce das alterações de saúde das vacas leiteiras (LeBlanc, 2010). Devido a isso, o estudo buscou validar o escore de enchimento ruminal como ferramenta de monitoramento no período pré-parto. O $EER \leq 2$ na 2ª semana pré-parto mostrou-se uma boa ferramenta para determinar o risco de desenvolver metrite, retenção de placenta, deslocamento de abomaso, mastite e afecções podais. Onde o $EER \leq 2$ apresentou 53% de Se e 80% de Es no diagnóstico de metrite e um $RR=4,51$ para desenvolver essa doença. O alto valor preditor do EER para diagnosticar doenças estaria relacionado à sua boa associação com a ingestão de matéria seca ($r=0,68$) (Burfeind et al., 2010). Diversos estudos comportamentais relataram que vacas

cursando com doenças no período de transição apresentaram diminuição do consumo de matéria seca, assim como do tempo de ingestão (Urton et al., 2005, Huzzey et al., 2007, Jawor et al., 2012). A este respeito, vacas com metrite reduziram o tempo de permanência no cocho em 75 minutos entre os -12 e -2 dias pré-parto, o que representou uma Se de 89% e Es de 62% para diagnóstico de metrite (Urton et al., 2005).

Já quando comparamos o valor diagnóstico do EER com o de indicadores sanguíneos pré-parto, como o NEFA que atualmente é utilizado como padrão ouro no pré-parto, vemos uma melhor Se e igual Es do EER. Como exemplo, quando se utiliza o ponto de corte de $NEFA \geq 0,37$ mmol/L no pré-parto para prever o risco de metrite, observa-se uma Se de 37% e Es de 80% (Ospina et al., 2010). Outro estudo usando um menor ponto de corte para prever metrite, $NEFA \geq 0,30$ mmol/L, aumentou-se a Se para 74% em detrimento da Es (39%) (Chapinal et al., 2011). Desta forma observa-se que o EER apresenta um melhor equilíbrio entre Se e Es, o que por sua vez estaria associado a um melhor razão de verossimilhança (RV) para metrite (RV+: 2,65; RV-: 0,59).

Do mesmo modo, o $EER \leq 2$ na semana -2 pré-parto foi um bom preditor de retenção placentária, com Se de 55% e Es de 80%, e um risco relativo de 2,75. Resultados que foram mais equilibrados que o $NEFA \geq 0,3$ mmol/L, na semana -1 pré-parto, que apresentou maior Se (67%), porém menor Es (46,5%) (Chapinal et al., 2011).

Similar, $EER \leq 2$ na semana -2 pré-parto foi melhor preditor de deslocamento de abomaso (Se= 66,7%; Es= 80%), que o NEFA na semana -1 pré-parto usando ponto de corte $\geq 0,27$ mmol/L (Se= 57%; Es= 62%) (Ospina et al., 2010), ou $\geq 0,50$ mmol/L (Se= 45%; Es= 75%) (Chapinal et al.). Por outro lado, quando comparamos a calcemia $\leq 2,35$ mmol/L na -1 semana pré-parto, vemos que apresentou menor valor diagnóstico (Se= 35%; Es= 71%) que NEFA (Chapinal et al., 2011).

No que diz respeito ao valor diagnóstico do EER2 na semana -2 pré-parto para diagnosticar mastite (Se= 60%; Es= 80%) e afecções podais (Se= 75%; Es= 80%), observa-se valores similares aos observados para as outras enfermidades do período de transição. Entretanto não foram encontrados estudos que validassem outras ferramentas preditoras no pré-parto para estas doenças. Porém, um estudo relatou que as vacas com afecções podais consumiram menor quantidade de alimento nas 2 semanas que antecederam um aumento do seu escore de claudicação (Norrington et al., 2014).

Por outro lado, com o aumento do uso dos colares comportamentais, tem-se proposto usar o índice de escore de saúde (*Health Index Score- HIS*) para monitoramento do rebanho. Este índice se basa na avaliação do tempo de ruminção e atividade diária para identificar o risco da vaca cursar com doenças (Stangaferro et al., 2016a). Observou-se que vacas que atingem um HIS <86 cursam com doenças entre 3 a 0,5 dias após atingir este índice, com Se variando entre 98% a 55 % (Stangaferro et al., 2016b). Entretanto, apesar da alta Se que este índice alcança, o limitado tempo entre a alteração comportamental e a ocorrência do desfecho de saúde, poderia limitar a implementação de estratégias preventivas eficazes.

Devemos ressaltar que no nosso estudo observamos uma alta incidência de doenças clínicas, o que pode ter impactado nos resultados do EER. Em animais de pastoreio foi relatado uma incidência de 45% de doenças clínicas (Sepulveda-Varas et al., 2015). Resultados similares foram observados em sistemas estabulados, onde se relata que 50% das vacas foram afetadas por doenças infecciosas ou metabólicas durante o período de transição (LeBlanc, 2010). A maior incidência de doenças clínicas no nosso estudo, em comparação aos outros estaria associado uma alta taxa de metrite (64,6%), mastite (20,4%) e de retenção placentária (19,5%).

Outros estudos relatam incidência de retenção de placenta entre 3,1% (Stevenson, 2000) e 9,4% (Bicalho et al., 2017). Já a incidência de metrite foi mais discrepante a da literatura onde se observa entre 15% (Bicalho et al., 2017) a 28% (Martinez et al., 2012) nos primeiros 12 dias de lactação. Esta discrepância na incidência da metrite, poderia estar relacionada ao maior tempo de seguimento das vacas, número de amostragens e critérios de diagnóstico. Os autores acima citados diagnosticaram vacas positivas a metrite quando apresentaram descarga marrom avermelhada ou purulenta com temperatura acima de 39,5°C, amostrando as vacas em apenas três oportunidades aos 4, 7 e 12 dias de lactação. Já no nosso estudo, os animais foram amostrados semanalmente durante todo o período de transição sendo positivas vacas com a descarga vaginal grau 3 ou 4 (Urton et al., 2005). Deste modo a incidência de metrite observada no nosso estudo, coincidiria com a incidência de 69% observada ao monitorar a descarga vaginal a cada 4±1 dias durante os primeiros 21 dias (Urton et al., 2005).

Outro fato que estaria associado com a alta incidência de metrite, foi a elevada incidência de retenção de placenta. Visto que a retenção placentária é um fator de risco para metrite (Vannucchi et al., 2016). As demais doenças apresentaram comportamento similar a da

literatura, onde se relata uma incidência de 5,1% de deslocamento de abomaso (LeBlanc et al., 2005), e 11,7 % de mastite (Sepulveda-Varas et al., 2015).

Outro achado do nosso estudo foi a associação do EER pré-parto com o regresso a ciclicidade das vacas. Onde vacas com baixo EER no pré-parto retornaram mais tardiamente a ciclicidade, que as com maiores EER. Entretanto, ressalta-se que vacas com menores EER apresentaram maior incidência de doenças o que leva a um viés de confusão nos resultados de regresso a ciclicidade. A este respeito, outro estudo observou que vacas com doenças clínicas e subclínicas durante o período de transição apresentaram menor taxa de retorno a ciclicidade, e menor taxa de prenhes (Ribeiro et al., 2013). Por outro lado, também foi relatado que vacas que diminuíram seu EER no pré-parto tiveram menor taxa de prenhez a 1ª inseminação (Kawashima et al., 2016). Desta forma podemos inferir que vacas com menores EER no pré-parto, não só apresentam maior risco de doenças como apresentam menor performance reprodutiva.

Conclusão

O escore de enchimento ruminal pré-parto foi um bom preditor de doenças do período de transição em vacas multíparas, como ponto de máxima sensibilidade e especificidade de $EER \leq 2$ as duas semanas prévias ao parto. Ademais, vacas com menores EER durante o pré-parto e na data do parto retornaram mais tardiamente a ciclicidade. Portanto, o escore de enchimento ruminal pode ser utilizado como estratégia de monitoramento pré-parto em vacas leiteiras multíparas.

Referências

Bicalho, M. L., E. C. Marques, R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2017. The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows. *Theriogenology* 88:270-282.

Bicalho, R. C., F. Vokey, H. N. Erb, and C. L. Guard. 2007. Visual locomotion scoring in the first seventy days in milk: impact on pregnancy and survival. *J Dairy Sci* 90(10):4586-4591.

Bradford, B. J., K. Yuan, J. K. Farney, L. K. Mamedova, and A. J. Carpenter. 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci* 98(10):6631-6650.

Burfeind, O., P. Sepulveda, M. A. von Keyserlingk, D. M. Weary, D. M. Veira, and W. Heuwieser. 2010. Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. *J Dairy Sci* 93(8):3635-3640.

Chapinal, N., M. Carson, T. F. Duffield, M. Capel, S. Godden, M. Overton, J. E. Santos, and S. J. LeBlanc. 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci* 94(10):4897-4903.

Espadamala, A., P. Pallares, A. Lago, and N. Silva-Del-Rio. 2016. Fresh-cow handling practices and methods for identification of health disorders on 45 dairy farms in California. *J Dairy Sci* 99(11):9319-9333.

Goldhawk, C., N. Chapinal, D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. von Keyserlingk. 2009. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. *J Dairy Sci* 92(10):4971-4977.

Gonzalez, L. A., B. J. Tolkamp, M. P. Coffey, A. Ferret, and I. Kyriazakis. 2008. Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. *J Dairy Sci* 91(3):1017-1028.

Huzzey, J. M., D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. von Keyserlingk. 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 90(7):3220-3233.

Jawor, P. E., J. M. Huzzey, S. J. LeBlanc, and M. A. von Keyserlingk. 2012. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *J Dairy Sci* 95(3):1240-1248.

Kawashima, C., C. Karaki, M. Munakata, M. Matsui, T. Shimizu, A. Miyamoto, and K. Kida. 2016. Association of rumen fill score and energy status during the close-up dry period with conception at first artificial insemination in dairy cows. *Anim Sci J* 87(10):1218-1224.

Le Blanc, S. J., K. D. Lissemore, D. F. Kelton, T. F. Duffield, and K. E. Leslie. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89(4):1267-1279.

LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev* 56 Suppl:S29-35.

LeBlanc, S. J., K. E. Leslie, and T. F. Duffield. 2005. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J Dairy Sci* 88(1):159-170.

Lukas, J. M., J. K. Reneau, R. L. Wallace, and A. De Vries. 2015. A study of methods for evaluating the success of the transition period in early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 98(1):250-262.

Martinez, N., C. A. Risco, F. S. Lima, R. S. Bisinotto, L. F. Greco, E. S. Ribeiro, F. Maunsell, K. Galvao, and J. E. Santos. 2012. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95(12):7158-7172.

- Norring, M., J. Haggman, H. Simojoki, P. Tamminen, C. Winckler, and M. Pastell. 2014. Short communication: Lameness impairs feeding behavior of dairy cows. *J Dairy Sci* 97(7):4317-4321.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci* 93(2):546-554.
- Ribeiro, E. S., F. S. Lima, L. F. Greco, R. S. Bisinotto, A. P. Monteiro, M. Favoreto, H. Ayres, R. S. Marsola, N. Martinez, W. W. Thatcher, and J. E. Santos. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci* 96(9):5682-5697.
- Seifi, H. A., S. J. Leblanc, K. E. Leslie, and T. F. Duffield. 2011. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J* 188(2):216-220.
- Sepulveda-Varas, P., D. M. Weary, M. Noro, and M. A. von Keyserlingk. 2015. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLoS One* 10(3):e0122317.
- Stangaferro, M. L., R. Wijma, L. S. Caixeta, M. A. Al-Abri, and J. O. Giordano. 2016 a. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part I. Metabolic and digestive disorders. *J Dairy Sci* 99(9):7395-7410.
- Stangaferro, M. L., R. Wijma, L. S. Caixeta, M. A. Al-Abri, and J. O. Giordano. 2016 b. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part III. Metritis. *J Dairy Sci* 99(9):7422-7433.
- Stevenson, M. A. 2000. Disease incidence in dairy herds in the southern highlands district of New South Wales, Australia. *Prev Vet Med* 43(1):1-11.
- Urton, G., M. A. von Keyserlingk, and D. M. Weary. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 88(8):2843-2849.
- Vannucchi, C. I., L. G. Silva, C. F. Lucio, and G. A. Veiga. 2016. Influence of the duration of calving and obstetric assistance on the placental retention index in Holstein dairy cows. *Anim Sci J*.
- Weary, D. M., J. M. Huzzey, and M. A. von Keyserlingk. 2009. Board-invited review: Using behavior to predict and identify ill health in animals. *J Anim Sci* 87(2):770-777.
- Zaaijer, D. and J. P. Noordhuizen. 2003. A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows. *Ir. Vet. J.* (56):145-151.

4. CONCLUSÃO

O escore de enchimento ruminal correlacionou-se positivamente com o escore de condição corporal das vacas, tanto no pré-parto como no pós-parto. Vacas com maiores EER apresentaram maiores concentrações de cálcio, BHBA e colesterol no pré-parto, e menores concentrações de NEFA no pós-parto, indicando um melhor balanço energético, possivelmente associado ao maior consumo. O EER também apresentou valor preditor para as doenças mais prevalentes do rebanho, como foi a metrite, mastite, retenção placentária, deslocamento de abomaso e afecções podais, de modo que vacas, onde vacas com $EER \leq 2$ na semana -2 pré-parto apresentaram maior risco de cursar com doenças. Finalmente observou-se que vacas com baixo EER no pré-parto retardam seu retorno a ciclicidade. Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam que o EER pode ser uma ferramenta promissora para ser utilizada no monitoramento dos rebanhos leiteiros.

5.REFERÊNCIAS

BICALHO, M. L, MARQUES E. C, GILBERT R. O, BICALHO R. C. The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows. **Theriogenology** . v.88, p.270-282. 2017.

BONDAN, C. Fatores que afetam a composição do leite bovino em rebanhos sob controle leiteiro: enfoque epidemiológico e metabólico. in Ciências Veterinárias. Vol. Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFGRS. 2015.

BURFEIND, O, SEPULVEDA P, von KEYSERLINGK M. A, WEARY D. M, VEIRA D. M, HEUWIESER W. Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. **J Dairy Sci** . v.93, n.8, p.3635-3640. 2010.

BURTON, J. L, MADSEN S. A, CHANG L. C, WEBER P. S, BUCKHAM K. R, VAN DORP R, HICKEY M. C, EARLEY B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. **Vet Immunol Immunopathol** . v.105, n.3-4, p.197-219. 2005.

DADO, R. G. ALLEN M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **J Dairy Sci** . v.78, n.1, p.118-133. 1995.

EDWARDS, J. L. TOZER P. R. Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. **J Dairy Sci** . v.87, n.2, p.524-531. 2004.

ESPADAMALA, A, PALLARES P, LAGO A, SILVA-DEL-RIO N. Fresh-cow handling practices and methods for identification of health disorders on 45 dairy farms in California. **J Dairy Sci** . v.99, n.11, p.9319-9333. 2016.

GOLDHAWK, C, CHAPINAL N, VEIRA D. M, WEARY D. M, von KEYSERLINGK M. A. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. **J Dairy Sci** . v.92, n.10, p.4971-4977. 2009.

GRUMMER, R. R, MASHEK D. G, HAYIRLI A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** . v.20, n.3, p.447-470. 2004.

GURETZKY, N. A, CARLSON D. B., GARRETT J. E., DRACKLEY J. K. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. **J Dairy Sci** . v.89, n.1, p.188-200.2006.

HAYIRLI, A, GRUMMER R. R., NORDHEIM E. V, CRUMP P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **J Dairy Sci** . v. 85, n.12, p.3430-3443. 2002.

HUZZEY, J. M., VEIRA D. M, WEARY D. M., von KEYSERLINGK M. A. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. **J Dairy Sci** v.90, n.7, p.3220-3233. 2007.

NGVARTSEN, K. L. ANDERSEN J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **J Dairy Sci** . v.83, n.7, p.1573-1597. 2000.

JAWOR, P. E., HUZZEY J. M., LEBLANC S. J., von KEYSERLINGK M. A. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. **J Dairy Sci** . v. 95, n.3, p.1240-1248. 2012.

KAMMES, K. L, ALLEN. M. S. Nutrient demand interacts with grass particle length to affect digestion responses and chewing activity in dairy cows. **J Dairy Sci** . v. 95, n.2, p.807-823. 2012.

KAUFMAN, E. I, LEBLANC S. J, MCBRIDE B. W, DUFFIELD T. F, DEVRIES T. J. Association of rumination time with subclinical ketosis in transition dairy cows. **J Dairy Sci** . v. 99, n.7, p.5604-5618. 2016.

KAWASHIMA, C, KARAKI. C, MUNAKATA. M, MATSUI. M, SHIMIZU. T, MIYAMOTO. A, KIDA. K. Association of rumen fill score and energy status during the close-up dry period with conception at first artificial insemination in dairy cows. **Anim Sci J** v.87, n.10, p.1218-1224. 2016.

LEBLANC, S. J, LISSEMORE K. D, KELTON D. F, DUFFIELD T. F, LESLIE K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **J Dairy Sci** .v.89, n.4, p.1267-1279.2006..

LIBOREIRO, D. N, MACHADO K. S, SILVA P. R, MATURANA M. M, NISHIMURA T. K, BRANDAOA. P, ENDRES M. I, CHEBEL R. C. Characterization of peripartum rumination and activity of cows diagnosed with metabolic and uterine diseases. **J Dairy Sci** . v.98, n.10, p.6812-6827. 2015.

LUKAS, J. M, RENEAU J. K, WALLACE R. L, DE VRIES A.. A study of methods for evaluating the success of the transition period in early-lactation dairy cows. **J Dairy Sci** v.98, n.1, p.250-262. 2015.

MARTINEZ, N, RISCO C. A, LIMA F. S, BISINOTTO, GRECO R. F, RIBEIRO E. S, MAUNSELL F, GALVAO K, SANTOS J. E. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **J Dairy Sci** 95(12):7158-7172.

MCART, J. A., NYDAM D. V, OETZEL G. R. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **J Dairy Sci** 95(9):5056-5066.

MCCARTHY, M. M, MANN S, NYDAM D. V, OVERTON T. R, MCART J. A. Short communication: concentrations of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. **J Dairy Sci**. v.98, n.9, p.6284-6290. 2015.

OSPINA, P. A, NYDAM D. V, STOKOL T, OVERTON T. R. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **J Dairy Sci**. v.93, n.2, p.546-554. 2010.

ROBERTS, T., CHAPINAL N, LEBLANC S. J, KELTON D. F, DUBUC J, DUFFIELD T. F. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. **J Dairy Sci** . v.95, n.6, p.3057-3063. 2012.

ROCHE, J. R., A. BELL W, OVERTON T. R, LOOR J. J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century – a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science**. 2013.

SCHIRMANN, K, WEARY D. M, HEUWIESER W, CHAPINAL N, CERRI R. L, von KEYSERLINGK M. A.. Short communication: Rumination and feeding behaviors differ between healthy and sick dairy cows during the transition period. **J Dairy Sci**. v. 99, v.12, p.9917-9924. 2016.

SEPULVEDA-VARAS, P, WEARY D. M, NORO M, von KEYSERLINGK M. A. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. **PLoS One**. v.10, n.3 p 0122317. 2015.

STANGAFERRO, M. L, WIJMA R, CAIXETA L. S, AL-ABRI M. A, GIORDANO J. O. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part I. Metabolic and digestive disorders. **J Dairy Sci** .v 99 n 9 p.7395-7410. 2016.

WEARY, D. M, HUZZEY J. M, von KEYSERLINGK M. A. Board-invited review: Using behavior to predict and identify ill health in animals. **J Anim Sci** . v 87 n 2 p770-777. 2009.

ZAAIJER, D. NOORDHUIZEN J. P.. A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows. **Ir. Vet. J.** v 56 p:145–151. 2003.