

Patrícia Vieira Maia

**VACINAÇÃO COM *Escherichia coli* J5 NO PERÍODO PRÉ-PARTO E
OCORRÊNCIA DE MASTITE, PRODUÇÃO DE LEITE E DESEMPENHO
REPRODUTIVO DE VACAS MISTIÇAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Último de Carvalho.

Belo Horizonte – MG

Escola de Veterinária – UFMG

2011

Dissertação defendida e aprovada em 12 de agosto de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Antônio Último de Carvalho
Orientador

Prof. Euler Rabelo

Prof. Lívio Ribeiro Molina

Prof^a. Sandra Gesteira Coelho

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, exemplos de vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar esta caminhada.

Aos meus pais por serem um alicerce em minha vida e pelo amor incondicional.

As minhas irmãs por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, dos confusos aos maravilhosos; pelo grande incentivo, motivação e apoio em todos os momentos.

Ao Dudu pela compreensão, apoio, incentivo e por me fazer acreditar que realmente sou capaz.

A Lourdinha pelo carinho e paciência.

Aos amigos e amigas por todo carinho, apoio e compreensão ao longo dessa caminhada.

Ao Clóvis Correa por todo o apoio.

A Ana Cristina V. Andrade pelas inúmeras horas de conversas e apoio. Por me ajudar e orientar nessa caminhada e tantas outras.

Ao Ernane, Geraldinho, Breno Silva, Raquel e toda a equipe da Fazenda Queima Ferro por toda ajuda na execução deste experimento.

A Daniela Barreto pela dedicação e presença ao longo do experimento.

À Biogénesis-Bagó nas pessoas do Dr. Reuel e Luiz Paulo pela oportunidade de execução deste trabalho.

Aos Profs. da Clínica de Ruminantes, Elias e Paulo Marcos e principalmente o Prof. Último pela acolhida e apoio.

Aos Profs. Idalmo e Ângela Maria e ao funcionário Danilo Bastos pelo auxílio com a estatística.

À Escola de Veterinária da UFMG e CNPQ.

E em especial:

Ao Professor Lívio Molina, que participou da construção da pessoa que sou hoje. Muito obrigada pelos ensinamentos e orientação. Mais que um mestre, um guia!

A todos que possibilitaram a execução deste trabalho, muito obrigada.

“A dúvida é a sala de espera do conhecimento”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Mastite ambiental	11
2.1.1 Mastites causadas por coliformes	11
2.1.2 A bactéria Escherichia coli	13
2.2 O período seco	15
2.2.1 Período inicial da involução da glândula mamária.....	15
2.2.2 Período de Estado Estacionário	16
2.2.3 Colostrogênese.....	16
2.2.4 A Lactoferrina no período seco	17
2.3 Mastite por coliformes no peri-parto	17
2.4 Mastite e Contagem de Células Somáticas.....	19
2.5 Mastite e Produção de Leite	21
2.6 Estratégias de controle da mastite no período seco	22
2.6.1 Tratamento de vacas secas.....	22
2.6.2 Vacinação com E. coli J5	23
2.7 Mastite e Reprodução	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Considerações sobre o rebanho	28
3.1.1 Considerações gerais	28
3.1.2 Considerações sobre rotina de ordenha e controle de mastite	28
3.1.3 Considerações sobre manejo reprodutivo.....	29
3.2 Tratamento dos animais.....	29
3.3 Imunização dos animais.....	30
3.4 Coleta de amostras.....	30
3.5 Diagnóstico microbiológico	30
3.5.1 Identificação dos microrganismos	30
3.5.3 Provas para identificação dos cocos Gram positivo e catalase negativo	31
3.5.4 Provas para identificação das bactérias Gram negativo.....	31
3.6 Produção de leite	32
3.7 Monitoramento da ocorrência de mastite	32
3.8 Análise estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Prevalência de infecções intramamárias na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas	33
4.2 Ocorrência de casos clínicos de mastite	35
4.3 Contagem de células somáticas	37
4.4 Produção de leite	39
4.5 Reprodução e Mastite	41
5 CONCLUSÕES.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação de bactérias dos gêneros <i>Streptococcus</i> e do gênero <i>Enterococcus</i> isolados de mastite bovina.....	31
Tabela 2 -	Identificação dos principais gêneros de bactérias Gram-negativa isolados de mastite bovina.....	32
Tabela 3 -	Prevalência de infecções intramamárias na secagem e no parto em vacas vacinadas e não vacinadas.....	34
Tabela 4 -	Ocorrência e duração de episódios clínicos de mastite nos primeiros 100 dias pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas.....	36
Tabela 5 -	Prevalência de mastite subclínica na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas.....	37
Tabela 6 -	Média da contagem de células somáticas na secagem e nos 100 primeiros dias após o parto (log10 células/mL), nos grupos vacinados e não vacinados.....	38
Tabela 7 -	Produção de leite (Kg de leite/vaca/dia) de vacas vacinadas e não vacinadas nos primeiros 100 dias de lactação.....	40
Tabela 8 -	Número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-parto em animais dos grupos vacinados e não vacinados.....	41
Tabela 9 -	Número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-parto em animais com mastite e sem mastite clínica.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS.....

BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Peterson
CCS	Contagem de Células Somáticas
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
Ig	Imunoglobulina
IFN-γ	Interferon – gama
IL	Interleucina
Th1	Linfócito T helper 1 (T auxiliar)
Th2	Linfócito T helper 2 (T auxiliar)
LPS	Lipopolissacarídeo
μl	Microlitros
mL	Mililitros
MHCII	Molécula Principal de Histocompatibilidade - classe II
NMC	National Mastitis Council
PMN	Polimorfonucleares
Kg	Quilos
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
O/F	Oxidação/fermentação no meio Hugh & Leifson

RESUMO

Avaliou-se a utilização da vacina *Escherichia coli* J5 no período pré-parto e ocorrência de mastite, produção de leite e desempenho reprodutivo em vacas mestiças leiteiras. A prevalência de infecções intramamárias por coliformes no pós-parto, a ocorrência e duração dos casos clínicos de mastite, a contagem de células somáticas, produção de leite, o número de animais inseminados e prenhes nos primeiros 100 dias de lactação e a taxa de concepção ao primeiro serviço foram analisados. Foram utilizadas 93 vacas, distribuídas em dois grupos experimentais, sendo: 43 vacas no grupo vacinado e 50 vacas no grupo não vacinado. As imunizações ocorreram 15 dias antes da data prevista para secagem, na secagem e 15 dias após a secagem. No dia da secagem e sete dias após o parto foram coletadas amostras de leite para diagnóstico microbiológico dos patógenos causadores de mastite. A ocorrência de casos clínicos de mastite foi verificada pela presença de alterações visíveis no leite utilizando o teste da caneca de fundo escuro durante as ordenhas. A duração e intensidade destes casos foram avaliadas. Amostras para contagem de células somáticas (CCS) foram coletadas mensalmente a partir do décimo dia de lactação até os primeiros 100 dias de lactação. A produção de leite foi registrada mensalmente nos primeiros 100 dias de lactação. A detecção de cio foi realizada por funcionário treinado, três vezes ao dia, após 40 dias pós-parto e as vacas que apresentaram cio foram inseminadas. O diagnóstico de gestação foi realizado a partir de 35 dias após a inseminação. Não houve redução na prevalência de infecções por coliformes entre a secagem e o parto nos dois grupos ($p < 0,05$). A duração total dos casos clínicos de mastite em animais que apresentaram mastite clínica foi menor em vacas vacinadas ($p < 0,05$). O número de episódios clínicos em relação ao total de animais no grupo vacinado e não vacinado e a intensidade dos casos clínicos não diferiu entre os grupos. ($p > 0,05$). A prevalência de animais com mastite subclínica no pós-parto e a CCS nos 100 primeiros dias de lactação foram menores no grupo de animais vacinados ($p < 0,05$). Entretanto, não foi observada diferença na produção de leite entre os grupos ($p > 0,05$). A taxa de concepção ao primeiro serviço e o número de animais prenhes até 100 dias de lactação não diferiu entre o grupo vacinado e não vacinado ($p > 0,05$), mas foram menores nos animais que apresentaram mastite clínica ($p < 0,05$). O número de animais inseminados até 100 dias de lactação não diferiu entre os grupos e entre os animais que apresentaram episódio clínico de mastite ($p > 0,05$). A vacinação de vacas com *E. coli* J5 melhora a saúde da glândula mamária de vacas leiteiras reduzindo a prevalência de animais com mastite subclínica no pós-parto, bem como a duração dos casos clínicos de mastite e a contagem de células somáticas na secagem e nos 100 primeiros dias de lactação. A produção de leite, a ocorrência de casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação e a eficiência reprodutiva não são alterados pela utilização da vacina *E. coli* J5.

Palavras-chave: mastite, coliformes, vacas leiteiras, vacina, *E. coli* J5, desempenho reprodutivo

ABSTRACT

The effect of immunization with *Escherichia coli* J5 vaccine in the pre-partum on the occurrence of mastitis, milk production and reproductive performance in crossbred dairy cows was evaluated. The prevalence of coliform intramammary infections at postpartum, occurrence and duration of clinical cases of mastitis, somatic cell count, milk production, number of animals inseminated and pregnant in the first 100 days of lactation and the conception rate to first service were analyzed. Ninety-three cows were used and distributed in two experimental groups, as follows: forty-three cows in the vaccinated group and fifty cows in the unvaccinated group. Immunizations occurred 15 days before the scheduled date of dry off, at dry off and 15 days after dry off. On the day of drying and seven days after calving milk samples were collected for microbiological diagnosis of mastitis. The occurrence of clinical mastitis cases was confirmed by visible changes in milk using the strip cup test during milking. The duration and intensity of these cases were evaluated. Milk samples for somatic cell count (SCC) were collected monthly from the day 10 to 100 of lactation. Milk production was recorded monthly for the first 100 days of lactation. The estrus detection was done by trained employee three times a day after 40 days postpartum. Pregnancy check was performed 35 days after insemination. There was no reduction in the prevalence of infections caused by coliforms between drying-off and parturition in both groups ($p>0,05$). The total duration of clinical mastitis in animals with clinical mastitis was lower in vaccinated ($p<0,05$) than unvaccinated cows. The number of clinical episodes and intensity of clinical cases did not differ between groups ($p>0,05$). The prevalence of animals with subclinical mastitis at postpartum and SCC in the first 100 days of lactation were lower in vaccinated ($p<0,05$) than unvaccinated cows. However, there was no difference in milk production between groups ($p>0,05$). The conception rate at first service and the number of pregnant animals up to 100 days of lactation did not differ between groups ($p>0,05$). However, animals with clinical mastitis had a lower conception rate and also a lower number of animals pregnant ($p<0,05$) than health animals. The number of animals inseminated up to 100 days of lactation did not differ between groups and between animals that had clinical episodes of mastitis ($p>0,05$). Vaccination of cows with *E. coli* J5 improves mammary gland health by reducing the prevalence of animals with subclinical mastitis at postpartum, as well as the duration of the clinical cases of mastitis and somatic cell count in the drying and the first 100 days of lactation. Milk production, the occurrence of clinical cases of mastitis in the first 100 days of lactation and the reproductive efficiency are not altered by use of the vaccine *E. coli* J5.

Key words: mastitis, coliforms, dairy cows, vaccine, *E. coli* J5, reproductive performance

1. INTRODUÇÃO

A utilização de programas de controle de mastite focados na mastite contagiosa gerou mudanças mundiais no padrão de infecção dos rebanhos, sendo atualmente os patógenos ambientais os principais microrganismos causadores de mastite em vários rebanhos em muitos países.

Os patógenos ambientais representam um grupo muito grande de organismos presentes no ambiente de permanência das vacas, podendo infectá-las direta ou indiretamente. Deste grupo, os coliformes se destacam pela importância na ocorrência de casos clínicos de mastite, levando a grandes prejuízos por vários fatores, incluindo diminuição da produção de leite, gastos com medicamentos, morte e/ou descarte precoce de animais.

A susceptibilidade da glândula mamária a novas infecções intramamárias é alta no início do período seco e no período pré-parto. As duas semanas pós-secagem e a última semana pré-parto são os momentos críticos para a aquisição de novas infecções intramamárias. Essas podem persistir na glândula mamária até a lactação seguinte e causar casos clínicos no início da lactação. Os antibióticos intramamários para vaca seca, utilizados com o intuito de prevenir novas infecções durante este período e eliminar infecções presentes no momento da secagem, geralmente são mais eficazes contra agentes gram-positivos e não persistem na glândula mamária até o período pré-parto, não sendo plenamente eficazes na prevenção de infecções que possam ocorrer nesse período pelas bactérias gram-negativas (Bradley e Green, 2001a; Halasa et al., 2009b; Sampimon et al., 2009).

Medidas mais eficazes para controlar a mastite por patógenos ambientais devem ser desenvolvidas, já que a terapia de vacas

secas não tem efeito absoluto no controle destes patógenos. O aumento da resistência das vacas a infecção intramamária pode ser uma estratégia usada para o controle das mastites ambientais.

A cepa rugosa mutante de *Escherichia coli* expressa um antígeno interno comum a todas as enterobactérias, permitindo o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra ampla gama de patógenos ambientais e tornando possível a imunização parenteral de vacas leiteiras (Elbien e Heath, 1965; Tyler et al., 1992; Dosogne et al., 2002). Estudos sobre imunização com *Escherichia coli* J5 em outros países têm demonstrado que sua utilização reduz significativamente a ocorrência de mastite clínica por bactérias gram-negativas, reduzindo também a gravidade e duração da doença quando a infecção intramamária é estabelecida e indicam que quando a taxa de vacas em lactação que apresentam casos clínicos de mastite causada por coliformes for acima de 1%, o uso de programa de vacinação utilizando *E. coli* J5 é recomendável e resulta em benefícios econômicos para a propriedade (Hogan et al., 1992c; Hogan et al., 1995).

As recomendações de esquemas de vacinação têm variado muito, mas tem sido realizado durante o período de maior risco de aquisição de novas infecções por coliformes, o período seco. O impacto do balanço energético negativo sobre as respostas a vacinação realizadas no periparto tem sido questionado (Goff e Horst, 1997) e a antecipação do protocolo de vacinação em relação a esse período sugerida (Petersson et al., 2006). Devido à alta taxa de novas infecções intramamárias por coliformes no período seco em vacas leiteiras, principalmente na fase inicial e final, e suas consequências sobre o desempenho produtivo dos animais, objetivou-se com este estudo avaliar o

efeito da vacinação com *Escherichia coli* J5 (Rotatec® - J5 Biogénesis-Bago – Paraná, Brasil) no período anterior a secagem e pré-parto sobre a ocorrência de mastite, produção de leite e desempenho reprodutivo em vacas mestiças leiteiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite ambiental

As infecções causadas por patógenos ambientais geralmente são de curta duração, freqüentemente resultam em mastite clínica e são menos propensas a causarem mastite subclínica (Smith, 1983). Os microrganismos causadores de mastite presentes no ambiente de permanência das vacas são chamados de patógenos ambientais - crescem em condições de alta temperatura e umidade e em presença de matéria orgânica, os mais comumente encontrados são espécies de bactérias gram-negativas, principalmente os coliformes (Smith e Hogan, 2008). Bactérias gram-negativas são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados de casos clínicos agudos de mastite (Hogan e Smith, 2003), sendo responsáveis por aproximadamente 40% dos casos clínicos de mastite (Smith et al., 1985a; Hogan et al., 1989).

Bactérias gram-negativas causadoras da mastite ambiental afetam todas as fazendas leiteiras e, geralmente, é o problema principal de mastite em explorações leiteiras bem geridas (Smith e Hogan, 1993). O controle de patógenos contagiosos, por meio da realização de programas efetivos de controle de mastite focados na redução da contagem de células somáticas (CCS), resultou em declínio na incidência global de mastite. Entretanto, os patógenos ambientais tornaram-se importante causa da doença e a mastite ambiental continua a ser uma das principais causas de perda financeira em fazendas

leiteiras (Green e Bradley, 1998; Bradley e Green, 2000; Bradley e Green, 2001a). Hogan et al. (1989) relatam que o controle da mastite subclínica com a subsequente redução na CCS do leite não diminui a incidência de mastite clínica e pode aumentar a susceptibilidade das vacas à mastite causada por coliformes.

2.1.1 Mastites causadas por coliformes

Coliformes são bastonetes gram-negativos, anaeróbicos facultativos, fermentadores de lactose da família *Enterobacteriaceae*, contaminantes fecais ou ambientais (Natzke e LeClair, 1975). O termo coliformes compreende as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Enterobacter sp* (Koneman et al., 1983). Outros gram-negativos não coliformes freqüentemente isolados de infecções mamárias incluem espécies de *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus* (Hogan e Smith, 2003).

A transferência de bactérias gram-negativas de glândulas mamárias de vacas infectadas para vacas não infectadas parece mínima comparada com a constante exposição ao meio ambiente contaminado. Bactérias coliformes ocupam muitos habitat no ambiente da vaca. *Escherichia coli* são habitantes normais do trato gastrointestinal de animais. *Klebsiella sp* e *Enterobacter sp* estão presentes nos solos, nos grãos, na água e no trato intestinal dos animais (Hogan e Smith, 2003).

A porta de entrada para bactérias coliformes dentro da glândula mamária é o canal do teto em contato com o ambiente contaminado (Jones, 1986; Hogan e Smith, 2003). Fatores de virulência dos coliformes permitem o crescimento e multiplicação no canal do teto e invasão das defesas do hospedeiro. Os coliformes multiplicam-se nas secreções no interior da glândula mamária, geralmente, sem se fixarem nas superfícies epiteliais. Embora a glândula

mamária não seja considerada habitat natural para os coliformes, muitas cepas são capazes de sobreviver e se multiplicar nas glândulas mamárias (Hogan et al., 1993; Hogan e Smith, 2003).

Na maioria dos rebanhos, a prevalência de mastites causadas por coliformes raramente excede 2% (Smith e Hogan, 2008) a 5% dos quartos mamários (Todhunter et al., 1991). Os coliformes são isolados em 30 a 40% dos casos de mastite (Smith e Hogan, 2008). Entretanto, aproximadamente 70% (Smith, 1983) a 85% das infecções por coliformes tornam-se clínicas e mais de 25% das vacas em rebanhos bem manejados são anualmente diagnosticadas com mastite clínica causada por coliformes (Smith et al., 1985a; Hogan et al., 1989; Hogan e Smith, 2003).

As infecções por coliformes tendem a ser de curta duração durante a lactação e raramente causam elevada CCS do tanque (Smith e Hogan, 2008). Apenas 24% das infecções por coliformes excedem 30 dias de duração (Smith, 1983). Cerca de 10% de casos clínicos causados por coliformes resultam em sinais sistêmicos incluindo febre, anorexia e alteração respiratória (Smith et al., 1985a; Hogan et al., 1989), perda de produção e morte (Natzke e LeClair, 1975). A severidade da doença clínica e o pico da contagem de coliformes nas secreções mamárias são positivamente correlacionadas (Hogan e Smith, 2003). A maioria das infecções por coliformes não resulta na forma aguda da doença (Smith, 1983), embora sejam as causas mais comuns de mastite com apresentação clínica sistêmica, sendo responsáveis por 60 a 70% dos casos clínicos agudos de mastite (Smith et al., 1985a; Hogan et al., 1989).

Infecções intramamárias por bactérias coliformes são mais frequentes durante os três primeiros meses e, especialmente, no primeiro mês de lactação (Smith et al.,

1985a; Todhunter et al., 1991). Nesse estágio de lactação os efeitos da mastite causada por coliformes são, geralmente, mais pronunciados (Smith e Hogan, 2008). A taxa de novas infecções causada por coliformes é maior durante o período seco do que durante a lactação (Eberhart et al., 1979; Smith, et al., 1985b; Eberhart, 1986; Hogan, et al., 1989), podendo ser de três a quatro vezes maior durante o período seco do que durante a lactação (Smith et al., 1985a).

A susceptibilidade para infecções é maior nas duas semanas após a secagem e nas duas semanas antes do parto. Dingwell et al. (2004) em estudo sobre ocorrência de novas infecções intramamárias durante o período seco, mostraram que 11% dos quartos, dos 1.178 analisados, desenvolveram infecção intramamária durante o período seco e que 30% dessas infecções foram causadas por coliformes. Bradley e Green (2000) citam que 60% das infecções causadas por coliformes ocorrem no período seco. Pesquisas mostram que 40,5% dos casos clínicos de mastite que ocorrem até 100 dias de lactação (Bradley e Green, 2000) e 65% dos casos que ocorrem nos dois primeiros meses de lactação são causados por coliformes e por infecções intramamárias que originaram durante o período seco (Smith, et al., 1985b; Smith et al., 1985a, Todhunter et al., 1990). O quarto mamário previamente infectado por coliformes na secagem tem risco maior de desenvolver mastite do que o quarto não infectado, sendo que em aproximadamente 70% dos quartos mamários que apresentam mastite por coliformes durante a lactação, a mesma espécie já havia sido detectada anteriormente na secagem, no período seco ou no pós-parto imediato (Bradley e Green, 2000).

Todhunter et al. (1990) coletaram amostras de secreções da glândula mamária durante o

período seco e relataram que, dos patógenos gram-negativos isolados, 31,8% eram *E. coli*, 46,8% *Klebsiella*, 6,2% *Enterobacter* e 9,2% *Serratia* e 2% eram outras bactérias gram-negativas. Dos coliformes, a *Escherichia coli* é, geralmente, a causa predominante de infecções intramamárias (Smith e Hogan, 2008).

Estudos têm demonstrado que vacas em rebanhos com baixa CCS do tanque de refrigeração podem ter susceptibilidade aumentada para mastite clínica. Barkema et al. (1998) em estudo para examinar a relação entre a CCS do tanque e a taxa de incidência de mastite clínica, verificaram que a medida que a CCS do tanque diminuiu, aumentou-se a taxa de mastite clínica e os casos clínicos de mastite por *E. coli* e *Klebsiella sp* tornaram-se mais frequentes.

2.1.2 A bactéria *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa anaeróbica facultativa, fermentadora de lactose, habitante normal do trato intestinal de mamíferos e membro da família *Enterobacteriaceae*. Muitas cepas de *E. coli* são inofensivas e até mesmo benéficas para o hospedeiro, mas outras, no entanto, são extremamente patogênicas (Callaway et al., 2003). A *E. coli* é onipresente no ambiente da vaca e se comporta como patógeno oportunista, podendo causar mastite quando o animal apresenta-se imunodeprimido (Burvenich et al., 2003).

Em estudo conduzido por Bradley e Green (2000), os autores relataram que a *E. coli* foi a causa mais comum de mastite clínica, sendo isolada em 34,7% dos casos. A média de duração de infecção intramamária por *E. coli* tende a ser menor que 10 dias (Smith e Hogan, 2008). As cepas de *E. coli* que produzem cápsula são mais prováveis de provocar infecção intramamária de longa

duração do que as cepas não encapsuladas (Hill et al., 1983).

A maioria das infecções causadas por *E. coli*, presentes na lactação e originada do período seco, ocorrem durante sete a 10 dias antes do parto (Todhunter et al., 1991). As infecções por outros gêneros de bactérias gram-negativas estão distribuídas entre o início e final do período seco (Smith, et al., 1985b). Bradley e Green (2000) encontraram alta taxa de novas infecções intramamárias por coliformes, inclusive *E. coli*, três semanas pré-parto, passando de 5,8% na secagem para 7,8% de quartos infectados, o que indica que a totalidade do período seco é crítica na aquisição de novas infecções. Os autores ainda concluem que a glândula mamária seca pode ser resistente a mastite clínica por *E. coli*, mas não é resistente a aquisição de novas infecções por este patógeno e que essa bactéria pode persistir em latência na glândula mamária durante o período seco, causando casos clínicos apenas na próxima lactação.

Fatores de virulência bacteriana são necessários para colonizar e infectar o hospedeiro e para lutar contra os mecanismos de defesa do mesmo. Os principais fatores de virulência para *E. coli* incluem toxinas, adesinas, proteínas secretadas em células hospedeiras, cápsulas de polissacarídeos e antígeno O, e outros mecanismos para resistir à destruição pelo sistema de complemento ou seqüestrar ferro (Lehtolainen, 2004).

Wenz et al (2006) em estudo com o objetivo de avaliar a relação entre diferentes isolados de *E. coli* de mastite e os diferentes níveis de gravidade de doença sistêmica sugeriram que cepas de *E. coli* que causam mastite aguda não possuem fatores de virulência específicos que contribuem para a doença clínica e que não é necessário fixação de bactérias no epitélio mamário na

patogenia da mastite aguda por coliformes. Esses concluíram, também, que a gravidade da mastite causada por *E. coli* é determinada principalmente por fatores da vaca, ao invés da patogenicidade bacteriana, pois os resultados do estudo não conseguiram identificar associação entre sorotipo, genótipo ou virulência e a gravidade da doença clínica.

A habilidade de utilizar lactose como fonte de energia e de sobreviver próximo a condições anaeróbicas são dois importantes fatores de virulência sendo a endotoxina o principal fator de virulência destas bactérias. A endotoxina ou LPS compreende a porção lipopolissacarídea da parede destas bactérias (Hogan e Smith, 2003). Esta é responsável pela patogenicidade e reações inflamatórias associadas com a mastite (Burvenich et al., 2003) e é liberada durante o crescimento e morte destas bactérias (Burvenich et al., 2007).

O lipopolissacarídeo (LPS) componente da parede de células de bactérias Gram-negativas é composto por três camadas: a mais externa de polissacarídeos hidrofílicos, na qual está localizado o antígeno O e K; a camada média composta por uma série de oligossacarídeos; e a mais interna e hidrofóbica composta por polissacarídeos do núcleo, o lipídio A (Elbien e Heath, 1965; Dosogne et al., 2002; Hogan e Smith, 2003). A porção mais interna do LPS, o lipídio A, é a porção tóxica das endotoxinas de Gram-negativos. As duas partes internas são estruturalmente similares em uma diversidade de bactérias Gram-negativas (Morrison e Ulevitch, 1978). As cepas de *E. coli* podem ser divididas em sorotipos ou sorovares O:H:K de acordo com as diferenças antigênicas das estruturas do antígeno O, antígeno K e antígeno H – flagelar (Lehtolainen, 2003). Mais de 700 tipos antigênicos ou sorotipos

de *E. coli* foram reconhecidos com base nos antígenos O, H e K, mas a camada interna da parede celular é comum a todos os sorotipos de *E. coli* e de todos os *Enterobacteriaceae* em geral (Burvenich et al., 2003).

A glândula mamária bovina é altamente sensível a baixas doses de LPS e a injeção deste na glândula de vacas saudáveis pode induzir a mastite (Paape et al., 1974). O LPS lançado durante a fase de multiplicação e/ou destruição do patógeno na cisterna do teto ou do úbere estimula a produção de grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios pelas células do hospedeiro, principalmente pelos macrófagos, células epiteliais e endoteliais (Burvenich et al., 2007). Os mediadores inflamatórios como as citocinas, como IL-1, IL-8 e TNF- α , são os principais responsáveis pela ocorrência dos sinais clínicos locais e sistêmicos visíveis da inflamação na mastite por *E. coli* como, por exemplo, dor, inchaço, vermelhidão, febre e anorexia (Burton et al., 2002). O edema formado no local da infecção, apesar de causar grande desconforto para o animal pela dor e inchaço e levar a alteração na produção e componentes do leite, auxilia na eliminação do patógeno por permitir a transudação de anticorpos e complemento do sangue para o úbere, facilitando a opsonização dos patógenos e eliminação destes pelos neutrófilos (Riollet et al., 2000).

A importância do uso de antibióticos administrados por via intramamária e sistêmica para o tratamento de casos clínicos de *E. coli* é questionável por causa da curta duração de infecções e da alta taxa de cura espontânea (Hogan e Smith, 2003). Além disso, a maioria das formulações de antibióticos para vacas em lactação não são eficientes contra os coliformes, inclusive *E. coli*, e a maioria

dos casos clínicos de mastite é tratada com pouca ou nenhuma idéia da causa microbiológica (Smith, 1983). Por esses motivos, os antibióticos disponíveis para tratamento de mastite clínica durante a lactação têm efeito mínimo sobre a duração das infecções intramamárias causadas por *E. coli* e devido a produção de LPS por essa bactéria, o tratamento da mastite clínica hiperaguda causada por esse patógeno muitas vezes envolve a terapia de suporte, incluindo soro por via oral e/ou intravenosa e antiinflamatórios (Hogan e Smith, 2003).

2.2 O período seco

No período seco, as duas semanas pós-secagem e as duas semanas pré-parto são os momentos críticos para a aquisição de novas infecções intramamárias (Smith et al. 1985b, Eberhart, 1986; Philpot e Nickerson, 2000). O período seco pode ser dividido em três estágios: involução ativa, iniciado logo após cessar a remoção de leite e abrange o período de transição do tecido de lactante para o estado de não lactante; período de estado estacionário; e a colostrogênese sendo o momento antes do parto que o tecido sofre remodelamento e começa a formação do colostro, o que culmina com o início de uma nova lactação (Hurley, 1989).

2.2.1 Período inicial da involução da glândula mamária

O período inicial da involução da glândula mamária coincide com o período de aumento da susceptibilidade para infecções intramamárias (Oliver e Sordillo, 1989). Após a secagem o úbere continua a sintetizar e secretar leite; sendo que o acúmulo máximo de líquido ocorre dois a três dias após a última ordenha, diminuindo nos dias seguintes. Há aumento da pressão interna do úbere devido à estase do leite causando encurtamento e dilatação do canal do teto permitindo a penetração de bactérias. Além disso, a imersão dos tetos em soluções desinfetantes é interrompida,

permitindo o aumento das populações bacterianas na pele do teto (Nickerson, 1989).

Com o avanço da involução, o úbere torna-se mais resistentes à infecção. Isto tem sido atribuído, em parte, à formação de um tampão de queratina no canal do teto que pode impedir a multiplicação e movimento ascendente das bactérias (Nickerson, 1989). De acordo com Comalli et al. (1984), o canal do teto dilata entre zero a sete dias pós-secagem e então constringe entre sete e 16 dias. Além disso, a formação do tampão de queratina com propriedades bacteriostáticas e que oclui fisicamente o canal do teto pode levar vários dias.

Estudo realizado com 300 vacas e 1.178 tetos, em cinco rebanhos mostrou que 50% dos tetos formaram o tampão de queratina na primeira semana do período seco e em 23% dos tetos a formação do tampão de queratina não ocorreu até seis semanas após o início do período seco. Além disso, vacas com produção de leite um dia antes da secagem acima de 21kg tiveram 1,8 vezes menos chance de formar o tampão de queratina. Como consequência, 35,6% destes animais desenvolveram infecção intramamária durante o período seco, comparado com 18% das vacas que produziam menos do que 21kg de leite um dia antes da secagem (Dingwell, et al., 2004). Estes autores mostraram, também, que 28,5% das vacas que demoraram mais do que três semanas para fechar todos os quatro tetos desenvolveram novo caso de infecção intramamária, em comparação com apenas 12,8% das vacas que formaram o tampão em todos os quatro tetos com menos de três semanas.

As concentrações de imunoglobulina (Smith et al, 1971), albumina sérica e lactoferrina nas secreções mamárias nesta fase são maiores em comparação com a lactação (Hurley e Rejman, 1986). Os

leucócitos aumentam nas secreções mamárias durante o início do período de involução e permanecem elevados. Neutrófilos PMN predominam no início da involução, após o qual leucócitos mononucleares (macrófagos e linfócitos) são predominantes (Mc Donald e Anderson, 1981). Leucócitos são envolvidos na fagocitose dos resíduos dos constituintes do leite e proteção da glândula mamária, por isso apresentam menor atividade nesta fase (Nickerson, 1989). O percentual de células T é menor no leite durante o peri-parto, mas aumenta no final da lactação. Por outro lado, os linfócitos B e macrófagos são mais elevados no peri-parto e diminuem no final da lactação, quando comparados com os linfócitos T (Park et al., 1992).

2.2.2 Período de Estado Estacionário

Nesta fase o volume de líquido na glândula mamária é reduzido a alguns mililitros e os constituintes do leite estão em concentrações mínimas, sendo desfavoráveis para o crescimento bacteriano. Componentes de defesa antibacteriana, como lactoferrina e fagócitos, são mantidos em concentrações elevadas em comparação com concentrações encontradas durante a lactação. A incidência de infecções intramamárias é mais baixa do que em qualquer outra fase do ciclo de lactação, sendo que a grande maioria dos tetos encontra-se com o tampão de queratina formado. Além disso, a taxa de cura espontânea é alta, e poucos casos clínicos de mastite ocorrem na glândula durante o estado estacionário (Nickerson, 1989; Burvenich et al., 2000). Apesar disso, Bradley e Green (2000) encontraram aumento das infecções por *E. coli* durante o período de estado estacionário, em relação ao início do período seco.

2.2.3 Colostrogênese

A última fase do período seco é a colostrogênese, que começa duas semanas antes do parto (Nickerson, 1989). Nesta fase ocorrem regeneração e diferenciação das células epiteliais secretoras e acúmulo de imunoglobulinas para a formação do colostro (Burvenich et al., 2007). Quando a secreção de colostro é iniciada e considerável acúmulo de fluido ocorre dentro da glândula mamária, a pressão intramamária aumenta. Ocorre então dilatação do canal do teto, perda do tampão de queratina e extravasamento da secreção, justificando parcialmente a maior susceptibilidade da glândula nesse período a novas infecções intramamárias (Oliver e Sordillo, 1988).

O período peri-parto no gado leiteiro é associado com diminuição na resposta imune e aumento na incidência de mastite (Oliver e Sordillo, 1988). Os efeitos do estresse associados à gestação e ao parto devido à síntese de hormônios estressores, como os corticosteróides, podem explicar parte da inabilidade imunológica nesse período (Waller, 2000). Estes hormônios levam a diminuição no número e função dos leucócitos no sangue e na migração dos neutrófilos para a glândula mamária (Burvenich et al., 2003). Além disso, no início da lactação há elevada demanda por nutrientes e energia devido ao aumento da atividade da glândula mamária, excedendo a capacidade de nutrientes que a vaca obtém na dieta. Por isso, a vaca entra em balanço energético negativo, gerando enormes desafios fisiológicos para os mecanismos homeostáticos da mesma, podendo levar a ocorrência de doenças metabólicas como cetose e deficiências nutricionais. O balanço energético negativo e o desenvolvimento de doenças metabólicas estão associados com a imunossupressão no periparto (Goff e Horst, 1997).

2.2.4 A Lactoferrina no período seco

Secreções da glândula mamária totalmente involuída não são favoráveis ao crescimento e multiplicação dos coliformes (Oliver e Bushe, 1987). O fator nutricional limitante para muitas bactérias coliformes na glândula mamária no período seco é o ferro. Este é fundamental para os coliformes cumprirem os processos metabólicos essenciais (Smith e Schanbacher, 1976). Lactoferrina é uma glicoproteína de ligação ao ferro encontrada, primeiramente, no leite e posteriormente, em outras secreções epiteliais e fluidos corporais de barreira. A lactoferrina bovina está presente em grânulos de polimorfonucleares e é sintetizada por células do epitélio glandular da glândula mamária (Chaneton et al., 2008). Esta aumenta nas secreções da glândula mamária durante a involução e mantém-se elevada até a colostrogênese (Hurley, 1989; Hogan e Smith, 2003). O aumento da concentração da lactoferrina começa dois a quatro dias após o término da ordenha regular e continua com aumento de 1,15 mg/ml por dia durante os primeiros 14 a 21 dias de involução. O pico de concentração de lactoferrina ocorre entre os 18 dias (Hurley, 1989) a três até quatro semanas do período de involução (Hyvonen, 2010). Nas secreções no úbere durante o período seco, a concentração é marcadamente alta, sendo cerca de 20mg/ml (Welty et al., 1976; Schanbacher et al., 1997), podendo chegar a 100mg/ml (Schanbacher et al., 1997). Cerca de dois dias para o parto a concentração de lactoferrina diminui, chegando a 1-2 mg/ml no colostro (Hyvonen, 2010) enquanto que o leite contém baixas concentrações de lactoferrina, aproximadamente 0,1mg/ml ou menos (Welty et al., 1976; Schanbacher et al., 1997). Nos casos de mastite clínica a secreção de lactoferrina encontra-se aumentada (Chaneton et al., 2008).

A lactoferrina tem propriedades bactericidas (Hurley, 1989) e bacteriostáticas (Kutilla et al., 2003). Essa se liga ao ferro e o torna indisponível para a bactéria, inibindo o crescimento bacteriano (Smith e Schanbacher, 1976). Coliformes que conseguem multiplicar nas secreções da glândula involuída provavelmente vencem os efeitos da lactoferrina pela utilização de sistema de alta afinidade de aquisição do ferro (Lin et al., 1999). A habilidade da *E. coli* e *Klebsiella sp* de causar mastite está relacionada com a capacidade destas de superar as propriedades inibitórias da lactoferrina (Todhunter et al., 1990). A glândula mamária infectada apresenta aumento na produção de lactoferrina e os coliformes são os patógenos mais susceptíveis a ação desta proteína (Chaneton et al., 2008).

2.3 Mastite por coliformes no peri-parto

Novas infecções por coliformes podem ocorrer por causas multifatoriais (Natzke e LeClair, 1975). As duas semanas antes do parto até as três primeiras semanas de lactação têm sido reconhecidas como período em que os mecanismos chave de defesa do hospedeiro estão dramaticamente alterados (Sordillo et al., 1997; Mallard et al., 1998). A resposta as infecções intramamárias durante o período pós-parto são variáveis (Dosogne et al., 2002). Como consequência, o gado leiteiro é mais susceptível a mastites durante o período peri-parto (Sordillo, 2005). A elevada prevalência de mastites por coliformes próximo ao parto e no início da lactação sugere que o estresse desta fase pode ser um fator adicional na ocorrência de mastite (Natzke e LeClair, 1975).

A primeira linha de defesa celular da glândula mamária de bovinos contra mastite por coliformes é a fagocitose e a morte de bactérias por neutrófilos (Van Werven, 1997). Neutrófilos são leucócitos não

específicos que tem sua atividade recrutada no local da infecção e são o principal tipo de célula encontrado no tecido mamário e secreções durante estágios iniciais do processo inflamatório associado com infecção bacteriana (Paape et al., 2003). Durante o período periparturiente uma série de funções dos neutrófilos é alterada ou prejudicada (Kehrli et al., 1989; Mallard et al., 1998; Burton e Erskine, 2003) e a diminuição na imunidade da glândula mamária é parcialmente devido a alterações nas funções dos neutrófilos (Kehrli et al., 1989). Embora o número de macrófagos seja elevado na última semana de gestação, a capacidade fagocitária dessas células está diminuída, possivelmente devido à menor atividade opsonizadora nas secreções mamárias (Detilleux et al., 1995).

A susceptibilidade das vacas para mastite severa por coliformes parece estar relacionada com o grau de neutropenia ou deficiência da função de PMN no sangue. Os mais importantes fatores de risco para mastite severa por coliformes são a lenta migração de PMN do sangue para a glândula mamária (Hill, 1981; Werven et al., 1997), assim como, a baixa atividade opsonizadora (Hill, 1981) e a deficiente atividade oxidativa dos mesmos (Heyneman et al., 1990). Adicionalmente, o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II expresso pelo macrófago bovino durante o período periparturiente está diminuído, o que pode contribuir para apresentação de um antígeno menos eficiente e resultar em resposta imune específica mais fraca dos linfócitos na glândula mamária (Shafer-Weaver e Sordillo, 1996).

Após a ligação das células apresentadoras de antígeno com as células T CD4+, a resposta imune pode ser classificada como resposta Th1 ou Th2. As respostas Th1 são caracterizadas pela ativação de macrófagos

e adesão, diapedese e opsonização por PMN e promove resposta contra patógenos intracelulares e viroses. Uma típica resposta de Th2 consiste em ativação das células B para proliferação e diferenciação em células produtoras de anticorpos, promovendo resposta humoral (Shafer-Weaver e Sordillo, 1996). A resposta imune do tipo Th1 envolve a produção de linfócitos (Th1 CD4+) que secretam altos níveis de IL 2 e INF- γ e consequente produção de IgG₂ pelos linfócitos B e migração de neutrófilos para a glândula mamária. Na resposta Th 2 as IL4, IL5 e IL10 são dominantes durante esta resposta, com produção de IgM e IgG₁ e menor recrutamento de PMN para a glândula mamária. Durante o meio e o final do período de lactação linfócitos agem principalmente como células Th1e produzem elevados níveis de IL-2 e IFN- γ . A resposta Th1 pode resultar em absorção embrionária, pois as citocinas produzidas são, geralmente, prejudiciais à manutenção da prenhez. Por isso, durante o período peri-parto, células CD4+ produzem menos IL2 e INF- γ , mas mais IL4 e IL10 comparado com células CD4+ obtidas durante estágios finais da lactação (Shafer-Weaver et al., 1999; Burton e Erskine, 2003). Linfócitos CD8+ obtidos no meio da lactação exibem atividade citotóxica e expressam principalmente INF- γ , enquanto que linfócitos CD8+ obtidos durante o pós-parto não exibem atividade citotóxica e expressam principalmente IL4 (Shafer-Weaver e Sordillo, 1996). A gestação pode modular a resposta imune para Th2 podendo, portanto, explicar a diminuição da capacidade de estabelecer adequada resposta Th1 durante a mastite por coliformes no pós-parto inicial de vacas leiteiras (Shafer-Weaver et al., 1999; Burton e Erskine, 2003). Essas alterações nos subconjuntos de linfócitos, particularmente CD4 e CD8, tem sido associadas com doenças imunossupressoras (Mallard et al., 1998).

Shafer-Weaver e Sordillo (1996) demonstraram que células linfóides do linfonodo mamário, isoladas de vacas no periparto apresentaram menor habilidade de matar bactérias que as células isoladas de vacas em lactação. Em parte, esta redução pode ser devido à diminuição de atividade destas células durante o periparto. Esta conclusão foi apoiada pela observação de que a adição de IL-2 exógena melhora a capacidade bactericida de todas as células linfóides, independente do estágio de lactação. Isto sugere que a IL-2 é capaz de aumentar a capacidade bactericida mesmo durante períodos de imunossupressão. Redução na secreção de IL-2 e INF- γ durante o pós-parto têm sido correlacionadas com aumento da incidência de mastite.

A primeira defesa solúvel da resposta imune específica são os anticorpos produzidos pelos linfócitos B antígeno ativado. IgG1 é o primeiro isotipo encontrado na secreção de glândulas mamárias saudáveis, mas IgG2 aumenta substancialmente durante inflamação da glândula mamária. Alguns isotipos (IgG1, IgG2 e IgM) podem atuar como opsoninas para melhorar a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. A IgA auxilia na aglutinação de bactérias invasoras, podendo prevenir a propagação da doença bacteriana na glândula mamária (Korhonen et al., 2000). A alteração da responsividade dos linfócitos a cerca do parto está relacionada com o aumento da susceptibilidade a mastite.

2.4 Mastite e Contagem de Células Somáticas

Quando as bactérias entram na glândula mamária e estabelecem uma infecção, um processo inflamatório é iniciado acompanhado pelo influxo de células brancas do sangue, alteração da função secretora, e mudanças no volume e composição da secreção mamária. Uma vez

que o número de células no leite está intimamente associado com inflamação e saúde do úbere, CCS são aceitas como medida padrão internacional de qualidade do leite. As células somáticas do leite são principalmente leucócitos ou células brancas do sangue, que incluem macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Harmon, 2001). Células epiteliais ou células que produzem leite são raramente encontradas nas secreções do úbere, incluindo na glândula mamária seca, sendo de 0 a 7% da população de células (Harmon, 2001). Os macrófagos são o tipo de células predominantes no leite normal e constituem entre 30 a 74% do total de células no leite (Burvenich et al., 2000). No entanto, quando a saúde da glândula mamária é alterada por uma infecção microbiana, o número e tipos de células somáticas predominantes passam por rápida transição, podendo os neutrófilos representar 95% destas células. Esta transição de uma glândula mamária saudável e com baixa CCS para uma secreção láctea contendo maior CCS, podendo ter alterações clínicas como a presença de coágulos, leva apenas algumas horas e faz parte de um mecanismo normal de defesa do hospedeiro (Kehrl e Shuster, 1994).

Quando a resposta inflamatória se inicia, ocorre afluxo de PMN para o tecido mamário. Os PMN normalmente fluem livremente através dos capilares apenas com a adesão mínima às paredes dos vasos. Durante a infecção e inflamação, ocorre aumento da permeabilidade vascular e PMN marginais ou aderidos ao endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, passam entre as células que revestem o vaso, alcançando o interior da glândula mamária. Mensageiros quimiotáticos liberados a partir de leucócitos presentes normalmente no leite ou nos tecidos lesados atraem PMN para o leite em grande

número. Em outras áreas com danos, os PMN podem passar entre as células epiteliais para o lúmen do alvéolo. Assim, o resultado final deste processo é o aumento da CCS no leite resultante da migração de PMN para o local da infecção. Os leucócitos no leite também podem liberar substâncias que alteram a permeabilidade dos vasos sanguíneos ou atraem mais leucócitos para a região da infecção. Com a persistente infecção bacteriana, o número de leucócitos pode variar, mas geralmente permanece alto. As células somáticas continuam elevadas após as bactérias serem eliminadas até ocorrer à cura da glândula mamária (Harmon, 1994). Após a eliminação efetiva da infecção, pode levar até três semanas para a CCS voltar para níveis pré-infecção (Werven et al., 1997).

Vários fatores afetam a contagem de células somáticas. Estádio de lactação, idade da vaca e nível de produção são alguns desses fatores, mas a infecção intramamária, ou seja, a mastite é o fator que mais afeta a CCS do leite (Dohoo e Meek, 1982; Philpot e Nickerson, 2000). A CCS pode ser mensurada em diferentes níveis, porém a CCS do tanque de expansão e a CCS individual do animal são as formas mais freqüentes e necessárias para o acompanhamento do status infeccioso dos rebanhos (Philpot e Nickerson, 2000).

Mastite subclínica está associada ao aumento da CCS do leite e tem várias conseqüências negativas, como por exemplo, a perda de produção de leite. Durante o desenvolvimento desta, há inflamação sem a presença visível de anormalidades no leite ou na glândula (Sordillo et al., 1997; Steeneveld et al., 2008). Uma das técnicas usadas para monitorar o nível ou a ocorrência de mastite subclínica em rebanhos de vacas ou individual ou de quartos mamários é determinar a contagem de células

somáticas de amostras de leite (Dohoo e Meek, 1982). A mastite clínica é caracterizada por elevada CCS no leite e sinais visuais de inflamação, tais como grumo, leite aguado, sanguinolento ou amarelado. A mastite clínica pode causar diminuição na ingestão da matéria seca, inchaço das glândulas mamárias e, em casos extremos de septicemia ou endotoxemia, podem levar o animal à morte (Bradley, 2002).

A reação inflamatória da glândula mamária após a invasão por bactérias é geralmente associada a rápida proliferação bacteriana no leite. Os macrófagos patogênicos ativados, as células epiteliais e endoteliais mamárias secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-8, TNF- α , com conseqüente migração massiva de anticorpos e neutrófilos do sangue para o leite e aumento pronunciado da CCS no leite (Riollet et al., 2000). Dohoo e Meek (1982) citam que a contagem de células somáticas em amostras de leite compostas de vacas com todos os quatro livres de infecção apresentam média de 113.000 a 251.000 céls./mL, dependendo da idade da vaca. Napel et al. (2009) relatam que quartos mamários de vacas que não apresentam infecção, geralmente apresentam CCS inferior a 25.000 céls./mL e a CCS dessas vacas é próximo a 100.000 céls./mL. Os quartos mamários que desenvolvem infecções ou apresentam CCS acima de 100.000 céls./mL com uma enorme variação, de acordo com o patógeno envolvido, idade da vaca e status imunológico do animal, entre outros, sendo que a CCS é elevada dez vezes ou mais dentro de poucas horas após a infecção. Quando a infecção é eliminada, a CCS pode retornar aos níveis pré-infecção, principalmente após a eliminação dos produtos resultantes desta infecção e o reparo do processo inflamatório, levando até três semanas para retornar a estes valores (Radostits et al., 1999; Napel et al.,

2009). Com o aumento da CCS, aumenta a porcentagem de patógenos isolados de amostra de leite de vacas em lactação (Jones et al., 1984).

A incidência de mastite clínica aumenta à medida que a CCS do tanque diminui sendo, neste caso, mais comum a ocorrência de mastite por bactérias gram-negativas, como *E. coli* e *Klebsiella sp* e sinais sistêmicos da doença são mais frequentes nestes rebanhos (Barkema et al., 1998). Green et al. (2004) verificaram que vacas que apresentaram caso clínico de mastite durante a lactação tiveram maior CCS do que as vacas que não apresentaram mastite clínica. Os autores relataram que baixas CCS durante a lactação foram associadas ao aumento de risco de casos clínicos por *E. coli*. Casos clínicos causados por estes patógenos são associados à rápida recuperação, visto que a elevação da CCS e o declínio da mesma são rápidos (Hass et al., 2004)

2.5 Mastite e Produção de Leite

A infecção intramamária provoca uma série de eventos na glândula mamária. Toxinas produzidas por bactérias ou mediadores da inflamação provocam danos no tecido secretor do leite, resultando em menor síntese total de leite (Shuster et al. 1991). Mudanças na permeabilidade dos vasos sanguíneos e no epitélio mamário podem levar ao extravasamento de componentes do sangue para o leite e o movimento de alguns componentes do leite normal para fora da luz do alvéolo, ou seja, para o espaço perivascular. Coágulos formados pela agregação de leucócitos e fatores de coagulação do sangue podem bloquear pequenos dutos e impedir a remoção completa do leite. Danos às células epiteliais e obstrução de pequenos dutos podem resultar na formação de tecido cicatricial em alguns casos com perda permanente da função de parte da glândula.

Em outros casos, após a redução do processo inflamatório, o reparo tecidual pode ocorrer e a função da parte afetada pode retornar ao normal na mesma lactação ou na seguinte (Harmon, 1994).

A relação entre a mastite subclínica e a produção de leite geralmente tem sido investigada em termos de efeitos associados às alterações na CCS. A magnitude da perda de produção de leite associada ao aumento da contagem de células somáticas depende do estágio de lactação e ordem de parto, sendo mais extensa no final da lactação independente do número de lactações (Hagnestam-Nielsen et al., 2009). A infusão de endotoxina na glândula mamária induz inflamação que imita a ocorrência natural de mastite, mas não tem nenhum efeito danoso diretamente sobre o epitélio mamário, sendo a redução na produção de leite devido à resposta inflamatória induzida e associada à reação sistêmica (Shuster et al, 1991). Portanto, embora o influxo de neutrófilos na glândula mamária inflamada certamente tenha efeito danoso diretamente sobre a produção de leite, efeitos sistêmicos da inflamação na produção de leite podem ser tão importantes quanto o influxo de neutrófilos (Kehrli e Shuster, 1994).

Com o avanço da lactação, o úbere se torna mais exposto a infecções por patógenos, resultando em danos glandulares permanentes, o que está relacionado com a maior perda de leite associado com aumento da CCS no final da lactação (Hortet et al., 1999). Hagnestam-Nielsen et al. (2009) relataram que a maior perda de produção foi relacionada com o aumento da CCS e tornou-se mais grave com o progresso da lactação, sendo mais intensa em vacas entre 33 e 44 semanas de lactação. Os autores relacionaram o aumento na perda de produção de leite na lactação tardia ao fato de que o úbere está

em estado catabólico. O processo degenerativo em curso pode influenciar a capacidade do úbere de se regenerar após a infecção e a capacidade de compensação dos quartos não infectados na produção de leite. A associação mais fraca entre CCS e perda de produção de leite diária foi encontrada entre a terceira e oitava semana de lactação. Os autores relatam que, mesmo sendo este momento de elevado risco para desenvolver mastite, a CCS foi menor que 50.000 céls./mL neste período, podendo ser explicada por efeito de diluição provocada pela alta produção de leite em torno de pico de produção.

No Brasil, foi observada redução de 7,1% na produção de leite dos animais com CCS entre 101.000 e 250.000, comparada com animais com CCS abaixo de 100.000. Os animais com CCS acima de 3.000.000 céls/ml apresentaram redução de 19,4% em relação aos animais com CCS inferior a 100.000 céls/ml (Cunha, 2005).

A CCS do tanque tem alta correlação com a prevalência de infecções intramamárias no rebanho e pode ser considerada como um bom parâmetro para detecção de problemas de mastite no rebanho e para avaliar a perda de produção de leite na propriedade devido a estes problemas. Para CCS de tanque de 200.000 céls./mL não se observa perda na produção de leite no rebanho, mas o percentual de perda de produção de leite pode chegar a 29% quando a CCS alcança os níveis de 1.500.000 céls./mL (NMC, 1987).

À medida que a CCS do tanque diminui a incidência de mastite clínica aumenta, principalmente por bactérias gram-negativas, como *E. coli* e *Klebsiella sp* (Barkema et al., 1998). Grohn et al. (2004) relatam que vacas com caso clínico de mastite causados por *E. coli* podem apresentar redução de 13Kg na produção de

leite diária. Após a recuperação do episódio clínico, estas produziram 7Kg a menos de leite/dia em comparação com as que não apresentaram mastite clínica pelo agente.

2.6 Estratégias de controle da mastite no período seco

2.6.1 Tratamento de vacas secas

A terapia de vaca seca, com o uso de antibiótico intramamário de longa duração durante o período seco, aplicado no momento da secagem, apresenta duas funções: em primeiro lugar combater infecções intramamárias pré existentes na secagem e evitar novas infecções intramamárias durante o período seco (Smith et al., 1966).

Pesquisas têm mostrado que a terapia de vacas secas não protege totalmente os animais de novas infecções por coliformes durante o período seco. Isso é explicado pelo fato de que muitas novas infecções por coliformes ocorrem no final do período seco quando a terapia de vaca seca não fornece proteção contra novas infecções intramamárias devido à baixa concentração do antibiótico na glândula mamária. Outra explicação é que o espectro de atividade de muitos produtos utilizados na terapia de vaca seca não tem ação sobre os microrganismos gram-negativos (Halassa et al., 2009b)

Bradley e Green (2001b) avaliaram o impacto do uso da terapia de vaca seca com antibiótico de amplo espectro (sulfato de frameticina, hidriodeto de penetamato, penicilina procaína) e outro antibiótico para vaca seca com espectro contra gram-positivos (cloxacilina benzatina). Houve menor ocorrência de mastite clínica por *E. coli* e coliformes e, conseqüentemente, no total de mastite nos 100 primeiros dias de lactação no grupo tratado com antibiótico com atividade contra gram-negativos. Não

houve diferença na probabilidade de desenvolver mastite por outros patógenos nos dois grupos. As vacas no grupo tratado com antibiótico à base de cloxacilina tiveram duas vezes mais chances de desenvolver mastite clínica por coliformes na lactação seguinte em comparação com o outro grupo tratado com antibiótico de amplo espectro. Não houve diferença significativa na contagem de células somáticas nos dois grupos após o parto. Berry e Hillerton (2002) estudaram o efeito da terapia de vaca seca aplicada a 236 vacas em dois rebanhos com baixa contagem de células somáticas de tanque (média de 150.000 céls./mL). O antibiótico utilizado no grupo tratado foi o cefalônio anidro, de amplo espectro. Os autores observaram que o número de novas infecções por coliformes não diferiu significativamente entre os grupos tratado e não tratado e concluíram que a reavaliação dos critérios de seleção de antibiótico utilizado na terapia de vacas secas é necessária, pois em rebanhos nos quais a CCS do tanque é baixa, o principal papel do uso de antibióticos na terapia de vaca seca é a prevenção de novas infecções intramamárias que neste momento são causadas por patógenos ambientais, em especial, por coliformes (Bradley e Green, 2001b).

2.6.2 Vacinação com *E. coli* J5

Práticas de manejo para reforçar a resistência da vaca são necessárias para controlar a mastite causada por coliformes, principalmente durante o período seco, momento de maior risco de aquisição de novas infecções (Smith, 1983; Smith e Hogan, 1993), já que a terapia de vacas secas não se mostrou completamente eficaz no controle de mastites causadas por coliformes (Halassa et al., 2009b).

A vacina com a cepa mutante rugosa *E. coli* O111:B4 (J5) tem sido utilizada, há mais de 15 anos, na imunização de vacas contra as

mastites causadas por coliformes. A bactéria *E. coli* rugosa mutante não tem enzimas requeridas para síntese normal do LPS da parede celular, o que resulta em incompleta formação do antígeno O ou oligossacarídeos, expondo o antígeno do núcleo (Elbien e Heath, 1965; Hogan e Smith, 2003). Sendo assim, a estrutura do LPS da *E. coli* J5, carece do antígeno O e consiste somente de lipídeo A e alguns polissacarídeos do núcleo. Juntos, esta estrutura de LPS é chamada de antígeno do núcleo (Dosogne et al., 2002). A proteção oferecida pela vacinação com *E. coli* J5 tem sido atribuída ao aumento do anticorpo contra antígenos do núcleo lipopolissacarídeo no soro e no leite (Tyler et al., 1991; Hogan et al., 1992c; Tomita et al., 2000; Dosogne et al., 2002) e a opsonização reforçada de bactérias e fagocitose pelos neutrófilos em resposta a infecção intramamária (Hogan et al., 1992b; Hogan et al., 1992c; Tomita et al., 2000; Dosogne et al., 2002). Entretanto, o mecanismo de atuação da imunização com *E. coli* J5 ainda não está claramente identificado (Dosogne et al., 2002; Wilson et al., 2009).

McCallus e Norcross (1987) desafiaram dois grupos de camundongos, um imunizado com J5 e o outro controle, com LPS extraído de uma cepa de *E. coli* isolada de caso clínico de mastite em vaca. A cepa foi cultivada por três ou 19 horas. A vacina protegeu os camundongos desafiados com LPS extraído de bactérias cultivadas por três horas, mas não de LPS extraído de bactérias cultivadas por 19 horas. Isso comprova que durante a infecção há rápida multiplicação das bactérias gram-negativas, assim anticorpos J5 podem ligar-se aos antígenos do núcleo exposto das bactérias, antes que a formação da cadeia lateral seja concluída, ou seja, quando o antígeno do núcleo é mais exposto. Os autores propuseram, então, que a reação cruzada

com as diferentes cepas é maior durante a fase de crescimento da bactéria quando a formação da cadeia lateral do polissacarídeo-O é incompleta, expondo assim o antígeno do núcleo.

Após a primeira vacinação subcutânea, o antígeno da vacina liga-se a células apresentadoras de antígenos, que podem ser macrófagos, células B ativadas, ou células dendríticas. Depois do processamento do antígeno, os produtos resultantes são expressos na superfície da membrana em conjunto com moléculas principais de histocompatibilidade classe II (MHCII). Células apresentadoras de antígeno migram para os tecidos linfóides, onde se ligam as células CD4+ (células T helper). Tanto CD4+ e CD8+ são células que podem desenvolver memória, resultando em uma forma mais rápida e acentuada de resposta após um segundo ou terceiro contato (Riollet et al., 2000). Então, após a vacinação, anticorpos são gerados contra o antígeno do núcleo (Tyler et al., 1990).

A resposta Th1 é preferencialmente determinada em vacas vacinadas contra *E. coli* (Dosogne et al., 2002). Após a infecção intramamária com *E. coli*, os animais vacinados apresentam elevados níveis séricos de IgG1 e IgG2. Já nos animais não vacinados, há predomínio da IgM. Essa mudança na produção de classe de imunoglobulinas em animais imunizados é considerada componente chave na eficácia da defesa do hospedeiro, principalmente relacionada a IgG2. Esta imunoglobulina é um importante anticorpo opsonizante que auxilia a fagocitose de bactérias por neutrófilos, favorecendo a resposta imunológica do tipo Th1, sendo este um dos principais benefícios da vacina *E. coli* J5 (Wilson et al., 2007b). Uma rápida disponibilidade de IgG2 contra *E. coli* J5 imediatamente após as bactérias entrarem na glândula mamária tem sido associada a

uma depuração mais efetiva das bactérias coliformes da glândula mamária, o que ocorre mais tardiamente em animais não vacinados (Shafer-Weaver et al., 1999).

Tomita et al. (1995 e 1998) demonstraram que os títulos séricos de IgG2 aumentaram nas vacas imunizadas 14 a 21 dias após a primeira imunização; e duas semanas após a segunda imunização. Wilson et al. (2009) relataram que os efeitos benéficos da vacina *E. coli* J5 podem ser observados até aproximadamente 100 dias após a última aplicação da mesma, pelo menos após aplicação de duas doses da vacina.

Altos títulos de anticorpos são associados com a diminuição da incidência de mastite clínica causada por coliformes (Tyler et al., 1988). A vacinação reforça as defesas do hospedeiro e as bactérias são eliminadas da glândula mamária sem que os sinais clínicos sejam detectados (Hogan et al., 1995). Reforçada secreção mamária de IgG específico para *E. coli* J5 reduz o pico de contagem bacteriana no leite e, conseqüentemente, os sinais clínicos de mastite (Hogan et al., 1992c). Gonzalez et al. (1989) observaram que vacas com títulos de IgG1 maiores que 1:240, reconhecendo o antígeno do núcleo de gram-negativos, tiveram 5,3 vezes menos riscos de sofrer mastite clínica por coliformes do que vacas com títulos menores. Apesar de aumentos nos títulos de anticorpos específicos no soro e no leite serem observados seguidos da vacinação com *E. coli* J5, a relação com incidência ou severidade da mastite nem sempre tem sido estabelecida (Tomita et al., 2000).

Ao avaliar os efeitos da vacina *E. coli* J5 na contagem de células somáticas, Hogan et al. (1995) observaram que sete dias após o desafio intramamário com *E. coli*, a CCS foi maior nas vacas controles em relação as vacinadas e que a produção de leite não diferiu entre os grupos. No protocolo

utilizado, a primeira imunização ocorreu na data da secagem, ou seja, 60 dias antes da data prevista para o parto; a segunda imunização 30 dias após a primeira; e a terceira imunização dentro de 48 horas após o parto. Hogan et al. (1999), entretanto, utilizando o mesmo protocolo, verificaram que a vacinação não teve efeito na CCS. A resposta típica de CCS iniciou três a seis horas após o pico de contagem bacteriana e alcançaram o valor máximo 24 horas após o desafio. A CCS dos dois grupos retornou aos valores anteriores ao desafio até 14 dias após o desafio.

O primeiro estudo em rebanhos para elucidar a eficácia da vacina em condições naturais de desafio por coliformes foi realizado por Gonzalez et al. (1989). Os animais foram vacinados no dia da secagem, 28 dias depois e 14 dias após o parto. A eficácia da vacina foi avaliada baseada na comparação da taxa de incidência de casos clínicos de mastite por coliformes nos grupos vacinados e não vacinados. A incidência no grupo vacinado foi de 2,57% e no grupo não vacinado de 12,77%. Durante os primeiros 90 dias de lactação, vacas vacinadas tiveram cinco vezes menos risco de sofrer casos clínicos de mastite do que vacas não vacinadas. O estudo mostrou que o uso da vacina reduz a incidência de mastite clínica causada por coliformes, mas não impede a ocorrência de infecções intramamárias por gram-negativos.

Wilson et al (2009) estudaram a ocorrência de casos naturais de mastite clínica em animais vacinados com *E. coli* J5 e não vacinados em rebanhos comerciais dos Estados Unidos e seu impacto sobre a produção de leite. A vacinação foi realizada no dia da secagem e 21 a 28 dias após a primeira aplicação. A maioria das vacas teve perda na produção de leite após o caso clínico de mastite, sendo a média de 7,0Kg

de leite/dia de perda de produção e esta não diferiu entre os grupos. A perda foi maior quando associada a casos clínicos de mastite causados por *E. coli*, e houve diferença significativa na perda diária de produção de leite para este patógeno entre vacinado (19,9kg) e controle (21,8Kg), sendo a perda maior para grupo controle.

Gentilini (2010) avaliou a eficácia da utilização de uma vacina comercial, contendo a bacterina *Escherichia coli* J5, na prevenção e controle das mastites clínicas causadas por coliformes, em especial a *Escherichia coli*. Foram realizadas três doses da vacina, sendo a primeira dose na secagem (60 dias antes do parto), a segunda 30 dias após a primeira dose e a última dose foi administrada na primeira semana após o parto. A vacinação com *E. coli* J5 demonstrou-se eficaz em reduzir a prevalência de infecções intramamárias no pós-parto, bem como a ocorrência e intensidade dos casos clínicos de mastite, causados por *E. coli*, nos primeiros 100 dias de lactação. A CCS não foi alterada pela utilização da vacina *E.coli* J5, mas os animais imunizados produziram mais leite nos primeiros 100 dias de lactação.

As recomendações de protocolo de vacinação contra mastite ambiental variam muito. Estes protocolos geralmente são realizados nos períodos de maior risco de aquisição de novas infecções por coliformes, ou seja, durante o período seco (Tomita et al., 2000). Alguns esquemas recomendam duas doses de vacinação com intervalo de 2 a 4 semanas, sendo a primeira dose na secagem e, em seguida, uma imunização repetida anualmente. Outro esquema sugerido é a imunização na secagem, ou seja, 60 dias antes da data prevista para o parto, a segunda dose 30 dias após a primeira e a terceira dentro de até duas semanas após o parto. Recentemente, pesquisadores têm

questionado o impacto do balanço energético negativo sobre as respostas a vacinações realizadas neste período, uma vez que a capacidade de resposta imune encontra-se de alguma maneira comprometida (Goff e Horst, 1997). Considerando o início do período seco como momento de alto risco de contaminação da glândula mamária (Eberhart et al, 1979; Smith et al., 1985b; Eberhart 1986; Hogan et al., 1989), e o intervalo de 14 dias para o estabelecimento de uma resposta imune efetiva (Tomita et al., 1995), a antecipação do início do protocolo de vacinação contra patógenos coliformes foi recomendada por Petersson, et al. (2006)

2.7 Mastite e Reprodução

Várias espécies de bactérias são capazes de invadir a glândula mamária, multiplicar e produzir substâncias prejudiciais ao desempenho reprodutivo. O aumento da PGF2 α foi encontrado no leite de vacas com mastite clínica (Anderson et al., 1986). Infusão intramamária de *Klebsiella pneumoniae* levou ao aumento no plasma e no leite de PGF2 α (Cullor, 1990). Evidências recentes sugerem que a liberação de endotoxinas por bactérias gram-negativas pode promover a liberação de mediadores inflamatórios, estimular a produção de PGF2 α , induzir a luteólise, e reduzir a taxa de concepção (Cullor, 1990; Hockett et al. 2000; Moore e O'Connor, 1993; Schrick et al., 1993; Barker et al., 1998; Schrick et al., 2001; Chebel et al., 2004).

Endotoxinas produzidas por bactérias gram-negativas resultam em liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina, o fator de necrose tumoral- α e várias outras moléculas (Bannerman, 2009). Estas citocinas têm sido associadas à perda embrionária (Hansen et al., 2004) por induzirem hipertermia, que inibe o

desenvolvimento do oócito e crescimento do embrião. As prostaglandinas estão presentes em todos os tecidos animais, exercendo várias funções e são parte de um grupo de eicosanóides, derivado do ácido araquidônico. As prostaglandinas, assim como os leucotrienos, têm sua síntese desencadeada por estímulos nas membranas celulares. A fosfolipase A, constituinte normal das membranas celulares, hidrolisa fosfolipídios da membrana liberando assim o ácido araquidônico. Este ácido liberado é então substrato para duas vias enzimáticas, a das cicloxigenases, que desencadeiam a síntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos (Freitas, 2007). Ao interagir com seus receptores no corpo lúteo, a PGF2 α bloqueia a síntese de progesterona, levando à luteólise (Carambula et al., 2002).

Gilbert et al. (1990) verificaram que a infusão de endotoxina de *E. coli* levou a encurtamento do ciclo estral em novilhas e sugeriram que a administração intravenosa de endotoxina influencia a função lútea pela ativação da cascata do ácido araquidônico, por efeito direto sobre o corpo lúteo, ou através de outros mediadores. Cullor (1990) ao realizar a infusão intramamária de *Klebsiella pneumoniae* em vacas, observou que as concentrações plasmáticas de cortisol e de PGF2 α aumentaram seguidas por diminuição das concentrações de progesterona em vacas prenhes, o que levou ao aborto quando administrada no primeiro trimestre, mas não quando infundido no segundo ou terceiro trimestre de gestação. Estes resultados sugeriram que a luteólise induzida pela endotoxina era mais prejudicial quando a progesterona placentária não estava disponível.

Estudo realizado por Barker et al. (1998) demonstrou que as vacas com mastite clínica entre a primeira inseminação e a

concepção necessitaram de uma inseminação adicional, o que aumentou o período de serviço nesses animais em comparação com as outras vacas sem mastite. Os autores explicam que esses resultados podem ter ocorrido devido à luteólise, com conseqüente perda de progesterona e morte embrionária. Esses autores, também, mostraram que não houve diferença no desempenho reprodutivo entre vacas com mastite clínica causada por patógenos gram-positivos ou gram-negativos. O fragmento de peptideoglicano, componente da parede de alguns patógenos gram-positivos, tais como espécies de *Streptococcus*, pode eventualmente produzir respostas que são semelhantes à infusão de endotoxina endovenosa e/ou a liberação desta nas mastites causadas por coliformes. Gunay e Gunay (2008) observaram que vacas que apresentaram mastite clínica tiveram o intervalo entre o parto até a concepção maior do que as vacas controle (94,1 dias), sendo o intervalo para vacas com mastite antes do primeiro serviço de 119,1 dias e para vacas com mastite clínica após o primeiro serviço de 141,7 dias.

Em ovelhas ovariectomizadas o efeito supressor da infusão venosa de endotoxina no eixo reprodutivo pode ser mediado centralmente através de uma inibição do GnRH e, portanto, a secreção pulsátil de LH (Battaglia et al., 1997). Os autores concluíram que o desafio com endotoxina inibe o eixo neuroendócrino reprodutivo coincidente com o estímulo a secreção de esteróides adrenais elevando a temperatura corporal. Estes resultados evidenciam que a endotoxina pode inibir a função reprodutiva neuroendócrina central pela liberação de GnRH pulsátil.

Vacas que apresentam infecção intramamária subclínica crônica ou eventos clínicos de curto prazo podem apresentar

atraso na ovulação (Lavon et al., 2010). Este atraso foi associado a baixas concentrações plasmáticas de estradiol e a baixo ou retardado pico de LH pré-ovulatório. Os autores demonstraram que das vacas com mastite, 26% apresentaram intervalo entre estro e ovulação mais longo que o normal ou não ovularam, contra apenas 4% do grupo sem mastite. Esse atraso foi iniciado principalmente a partir da depressão direta da produção de estradiol, resultando na redução pré-ovulatória das concentrações de estradiol. Por conseguinte, o efeito estimulante do estradiol sobre indução de GnRH para aumentar a secreção de LH provavelmente foi deprimido, o que resultou na ovulação atrasada (Lavon et al., 2010). Hockett et al. (2005) demonstraram que vacas com mastite clínica podem ter perturbações na fisiologia normal, incluindo diminuição nos pulsos de LH, ausência de pico de LH e de comportamento estral, supressão do estradiol e falha na ovulação.

Wilson et al. (2008) analisaram o efeito da vacina contra mastite ambiental e da mastite clínica no desempenho reprodutivo. As vacas que tiveram mastite clínica foram associadas com maiores número de dias em aberto e intervalo do parto até a concepção. As vacas com mastite foram menos propensas a se tornarem prenhes (47%) em comparação com as vacas do grupo controle (78%). Os patógenos *Escherichia coli* e *Streptococcus sp* foram associados de forma significativa com a redução da prenhez, pois apenas 40% das vacas com mastite clínicas por estes patógenos ficaram prenhes, sendo a probabilidade de concepção 50% menor em comparação com o grupo controle. Apesar das diferenças observadas entre animais com mastite clínica e sem mastite clínica, os autores não observaram diferenças no desempenho reprodutivo entre os grupos vacinados e não vacinados.

A ocorrência de mastite clínica imediatamente após a inseminação artificial foi associada à menor probabilidade de concepção (Hertl et al., 2010). Os autores observaram que as vacas que apresentaram caso clínico de mastite entre zero a sete dias após a inseminação apresentaram menor taxa de concepção. Casos clínicos causados por bactérias gram-negativas foram associados à redução mais acentuada na taxa de concepção do que por outros microrganismos. Os pesquisadores concluíram que a mastite clínica causada por patógenos gram-negativos, que ocorre imediatamente após a inseminação artificial pode estar associada com menor taxa de concepção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações sobre o rebanho

3.1.1 Considerações gerais

O estudo foi realizado entre abril de 2010 a janeiro de 2011, em um rebanho comercial localizado no município de Pitangui, Minas Gerais, composto de 700 vacas mestiças (1/2, 3/4, 7/8, 15/16) Holandês x Gir em lactação, com produção média de 21 kg de leite/dia. Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia em intervalo de 12 horas, em equipamento mecânico tipo espinha de peixe, linha baixa, com 24 conjuntos (2x12=24) e mecanismo de extração automática de teteiras.

As vacas foram confinadas em piquetes durante o período de seca, ou seja, março a outubro recebendo a dieta completa nos cochos. E durante o período de chuvas, outubro a fevereiro, foram mantidas a pasto e recebendo concentrado nos comedouros, ao final de cada ordenha.

A dieta das vacas em lactação constituía-se de silagem de milho e cana como volumoso, para a época de confinamento, e como concentrado, uma combinação de

milho, farelo de soja, polpa cítrica e pré mix comercial mineral e vitamínico. O sal comum era fornecido à vontade nos comedouros, bem como água limpa, disponível em bebedouros distribuídos pelos piquetes.

3.1.2 Considerações sobre rotina de ordenha e controle de mastite

A rotina de ordenha era realizada na seguinte ordem: teste da caneca telada, para diagnóstico de casos clínicos de mastite; desinfecção dos tetos antes da ordenha (pré-dipping) com solução desinfetante à base de hipoclorito de sódio a 3%, mantida em frasco sem retorno; secagem dos tetos com papel-toalha descartável, utilizando um papel por teto; desinfecção dos tetos após a ordenha (pós-dipping) com solução de iodo a 1%, mantida em frasco sem retorno. A limpeza do equipamento de ordenha era realizada em quatro etapas: pré-enxágue com água a 40°C; circulação de detergente alcalino clorado em água a 70°C por dez minutos, com controle da temperatura da água cuja temperatura final era de 40°C; enxágue com detergente ácido em água fria; sanitização com solução clorada em água fria, por cinco minutos, 30 minutos antes de cada ordenha.

A fazenda adota programa intensivo de controle de mastite por meio dos seguintes procedimentos: rotina de ordenha higiênica, utilização de terapia de vacas secas, manutenção da limpeza do ambiente de permanência dos animais, adequada limpeza e manutenção do equipamento de ordenha e tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite. As vacas com contagem de células somáticas (CCS), constantemente, acima de 250.000 céls./mL, isto é, vacas cronicamente infectadas, eram identificadas por meio de correntes no pescoço e ordenhadas separadamente do restante do rebanho, sendo o penúltimo lote na linha de ordenha.

O último lote era formado por vacas em tratamento para mastite clínica, cujo leite era ordenhado diretamente em latões e descartado. Vacas, com mastite clínica ou subclínica crônica por mais de uma lactação e com CCS mensal acima de 400.000 cels./mL e não responsivas a pelo menos três tratamentos para mastite clínica, eram descartadas do rebanho.

Havia, também, controle intensivo de patógenos contagiosos na fazenda, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, de baixa prevalência na fazenda. Resultados de cultura microbiológica do tanque de refrigeração e culturas individuais realizados antes do início do estudo demonstravam que as infecções intramamárias eram causadas predominantemente por patógenos ambientais.

3.1.3 Considerações sobre manejo reprodutivo

Durante a lactação, a detecção de cio era realizada por um funcionário treinado por meio da observação das vacas três vezes ao dia para verificar a apresentação de sinais de cio. O responsável por trazer as vacas do piquete para a sala de ordenha, também, observava as vacas que apresentavam cio. Além disso, todos os funcionários da fazenda participavam regularmente da identificação das vacas em cio durante todo o dia.

O animal era considerado em cio quando aceitava monta de um rufião ou das companheiras de lote. Outros sinais, como, animal muito agitado, vulva inchada, realização de monta em outros animais, presença de muco na vulva também eram observados.

Após o parto, as vacas eram submetidas a período de espera voluntário de 40 dias antes da primeira inseminação, ou seja, vacas que apresentavam cio antes de 40

dias em lactação, não eram inseminadas. As vacas que apresentavam cio até oito horas da manhã eram inseminadas na parte da manhã e as vacas que apresentavam cio até 18 horas da tarde eram inseminadas à tarde.

Exames reprodutivos, através de palpação retal, para avaliação do retorno a atividade ovariana e involução uterina eram realizados a cada 15 dias, a partir do décimo dia pós parto. O diagnóstico de gestação era realizado a partir de 35 dias após a inseminação. Os dados de data de parto, inseminações e diagnósticos ginecológicos eram armazenados em software de controle zootécnico e gerencial.

3.2 Tratamento dos animais

O estudo foi composto por 93 animais balanceados de acordo com a ordem de parto, produção de leite, média de contagem de células somáticas da última lactação e provável data de parto. Ao iniciar o experimento, 15 dias antes da secagem, os grupos não apresentavam diferença quanto a CCS ($p > 0,05$). Desta forma, os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos: **Vacinado** ($n = 43$) – grupo de vacas vacinadas que receberam três doses de vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5 Biogénesis-Bago – Paraná, Brasil); **Controle** ($n = 50$) – grupo de vacas controle que receberam nenhuma dose da vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5 Biogénesis-Bago – Paraná, Brasil). No dia da secagem, foi realizado o tratamento de todas as vacas com infusão intramamária de antibiótico específico para vaca seca à base de cloxacilina benzatina, 60 dias antes do parto previsto.

Os animais foram imunizados com vacina comercial *Escherichia coli* (Rotatec® - J5 Biogénesis-Bago – Paraná, Brasil) obedecendo ao seguinte protocolo: Grupo Vacinado - três aplicações por via subcutânea na dose de 3 mL, aplicadas com

seringa dosadora no terço médio do pescoço - a primeira dose 15 dias antes da data prevista da secagem, a segunda no dia da secagem e a terceira 15 dias após a secagem. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições quanto às instalações, alimentação e ambiente, durante o período experimental.

3.3 Imunização dos animais

Para imunização dos animais, utilizou-se uma vacina comercial Rotatec® - J5 Biogénese-Bago – Paraná, Brasil. A vacina era composta de uma fase aquosa (40%, 1,2 ml) e uma fase oleosa (60%, 1,8 ml), contendo 1×10^7 UFF de Rotavírus G6, $1 \times 10^{6.5}$ de Rotavírus G10 e 1×10^9 de *Escherichia coli* J5.

3.4 Coleta de amostras

No momento da secagem e até sete dias após o parto, amostras de leite foram coletadas para diagnóstico microbiológico individual visando à identificação de patógenos causadores de mastite. As amostras de leite foram obtidas imediatamente antes da ordenha, após descarte dos três primeiros jatos de leite, desinfecção dos tetos com solução de hipoclorito de sódio e secagem com papel toalha descartável. No momento da coleta, realizou-se antissepsia da ponta teto utilizando algodão umedecido em álcool a 70%. Os jatos dos quatro tetos formaram uma amostra composta e foram acondicionada em frascos estéreis previamente identificados. O material amostrado foi congelado e, então, encaminhado em recipiente isotérmico, com gelo, ao laboratório Vida Vet® em Botucatu – SP para isolamento e caracterização dos microrganismos.

Amostras de leite compostas e individuais, destinadas à contagem de células somáticas, foram coletadas no dia da secagem e mensalmente a partir do décimo dia de

lactação. As coletas foram realizadas na ordenha da manhã, sendo as amostras retiradas diretamente de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha, os quais coletam alíquotas de leite, representando assim, a produção de leite total do animal. Após homogeneização do leite, pelo acionamento de um botão no medidor que permite a entrada de ar e homogeneização do mesmo, as amostras foram coletadas e acondicionadas em frascos contendo comprimido conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), permitindo a conservação do leite à temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas por inversão do frasco, até a completa dissolução dos comprimidos, e enviadas ao laboratório Clínica do Leite – ESALQ/USP, Piracicaba - SP. As análises de CCS foram realizadas pelo método eletrônico em equipamento Bentley CombSystem 2300® (Bentley Instruments®).

3.5 Diagnóstico microbiológico

3.5.1 Identificação dos microrganismos

O isolamento e caracterização dos microrganismos causadores de mastite foram realizados a partir das amostras de leite coletadas antes da ordenha e enviadas ao laboratório Vida Vet® em Botucatu – SP. Volumes de 10 µl de cada amostra foram semeados com alça calibrada e descartável em cada quadrante de uma placa de Agar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, seguindo-se incubação a 35° C, por 24 horas, de acordo com as recomendações de Harmon et al. (1990).

Após o período de incubação, realizou-se a primeira leitura das placas, observando-se o crescimento microbiano, aspecto, coloração e o número de colônias presentes. Em seguida, as placas foram incubadas novamente a 35° C por mais 24 horas,

realizando-se segunda leitura após o período total de 48 horas de incubação. Nas amostras de leite que apresentaram crescimento de microrganismos, selecionou-se uma colônia representativa, a qual foi semeada em ágar BHI (Brain Heart Infusion – ágar infusão de cérebro e coração) e incubada a 35 °C por 24 horas. Após este período, os isolados foram examinados ao microscópio, em esfregaços corados pela técnica de Gram e avaliados quanto à produção de catalase para, então, serem submetidos aos testes de identificação (Brito e Brito, 1999).

3.5.2 Provas de identificação dos cocos Gram positivo e catalase positivo

Para diferenciação das bactérias deste grupo, empregou-se os testes de coagulação do plasma de coelho e produção de

acetoína. As bactérias positivas na produção de coagulase e acetoína foram classificadas como *Staphylococcus aureus*. Aquelas negativas no teste de coagulase foram identificadas como *Staphylococcus sp.* coagulase-negativos (Brito et al.,2002).

3.5.3 Provas para identificação dos cocos Gram positivo e catalase negativo

Este grupo foi identificado pelo teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), hidrólise do hipurato de sódio, crescimento em presença de 6,5% de NaCl, crescimento em meio contendo bile e esculina e hidrólise da esculina. A classificação foi feita de acordo com Brito e Brito (1999), como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e do gênero *Enterococcus* isolados de mastite bovina

Espécies	CAMP	Esculina	Hipurato de Sódio	6,5% NaCl	Bile-esculina
<i>S.agalactiae</i>	+	-	+	V	-
<i>S. uberis</i>	V	+	+	-	-
<i>S.bovis</i>	-	+	-	-	+
<i>Enterococcus sp.</i>	-	+	V	+	+
<i>Streptococcus sp.</i>	-	+	-	-	-

v: reação variável: 10 a 89% das amostras positivas

3.5.4 Provas para identificação das bactérias Gram negativo

As bactérias Gram negativas foram semeadas em estrias em Agar MacConkey para verificar a utilização da lactose e no meio de Triple Sugar Iron (TSI: Agar tríplice açúcar e ferro) para identificação presuntiva (Harmon et al.,1990). Em seguida foram avaliadas pelos testes de produção de catalase, oxidase, indol, urease, reação de VM, de VP, mobilidade, utilização de citrato de sódio e oxidação/fermentação no meio Hugh &

Leifson. A diferenciação entre gêneros encontra-se demonstrada na Tabela 2 (Brito e Brito, 1999).

Tabela 2. Identificação dos principais gêneros de bactérias Gram-negativa isolados de mastite bovina

Características	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Mobilidade	+/-	-	+	+	+	+
Prod. Indol	+	-/+	-	-/+	+	-
VM	+	-	-	+	+	-
VP	-	+	+	-	-	-
Utiliz. Citrato	-	+	+	+	v	-
Prod.urease	-	-	-	-	+	-

v: diferentes reações observadas

3.6 Produção de leite

A produção de leite individual das vacas foi avaliada, mensalmente, nos 100 primeiros dias de lactação por meio de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha, nas ordenhas da manhã e da tarde.

3.7 Monitoramento da ocorrência de mastite

O monitoramento da ocorrência de mastite subclínica foi feito pelo acompanhamento da CCS individual dos animais. Considerou-se portador de mastite subclínica o animal que apresentou CCS > 250.000 céls./mL, de acordo com Green et al. (2002).

A ocorrência de mastite clínica foi determinada pelo teste da caneca telada, realizado antes de cada ordenha. Os casos clínicos de mastite foram classificados, de acordo com sua intensidade, em grau 1 - apenas alterações visíveis no leite, isto é, presença de coágulos, leite anormal; grau 2 - presença de coágulos e inflamação no úbere (úbere avermelhado e edemaciado); e grau 3 - coágulos, inflamação no úbere e sinais clínicos sistêmicos (desidratação, depressão, anorexia) (Bradley e Green,

2001a). A apresentação de alterações visíveis no leite dentro de 14 dias do final do tratamento do episódio de mastite clínica anterior foi considerado o mesmo caso clínico. Se o animal apresentou novo episódio após 14 dias do episódio ocorrido, esse constituiu um novo caso clínico (Wilson et al, 2009).

Os animais que apresentaram caso clínico de mastite receberam tratamento imediatamente após o diagnóstico, de maneira diferenciada, de acordo com o grau de intensidade. Os tratamentos com antibiótico intramamário, para os graus 1 e 2, foram realizados segundo o seguinte protocolo: antibiótico intramamário base 1 (flumetazona, neomicina e espiramicina), por três dias consecutivos, com duas aplicações ao dia, totalizando seis aplicações. Para os animais não responsivos ao tratamento até o terceiro dia, iniciava-se o novo tratamento com antibiótico intramamário base 2 (cloridrato de oxitetraciclina, sulfato de neomicina e prednisolona), também pelo mesmo período e, não havendo resposta, iniciava-se o tratamento com antibiótico intramamário base 3 (cefalexina, neomicina, miconazol e prednisolona).

Para os casos clínicos de grau 2, foi realizado tratamento com antibiótico intramamário associado a anti-inflamatório parenteral (flunexina meglumina) por três dias consecutivos. Os casos clínicos de grau 3 receberam tratamento com antibiótico intramamário, associado a aplicação parenteral de oxitetraciclina ou tilosina, e anti-inflamatório (flunexina meglumina) por três dias consecutivos além de tratamento de suporte constituído por 20 litros de soro por via oral, composto por 20 litros de água, 160 gramas de sal comum (NaCl), 20 gramas de cloreto de potássio (KCl) e 10 gramas de cloreto de cálcio (CaCl₂) e realização de seis ordenhas diárias após aplicação de ocitocina.

Foram consideradas a duração e a intensidade de casos clínicos durante o período experimental para todos os grupos, bem como o número de dias para cura clínica (período até o desaparecimento dos sintomas) e o período de descarte do leite, objetivando a comparação destes parâmetros entre os grupos vacinado e não vacinado.

3.8 Análise estatística

Para a análise dos dados relacionados a produção e CCS do leite utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso em sistemas de parcelas subdivididas, sendo duas parcelas e 4 subparcelas, com os grupos, vacinado e não vacinado, nas parcelas e os períodos de coleta nas subparcelas. Para as médias de CCS, antes da secagem e até 100 dias de lactação e de produção de leite nos primeiros 100 dias de lactação, realizou-se o teste t, pelo procedimento Mixed do programa SAS, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), utilizando dias em lactação como covariável. Para a duração de casos clínicos, foi realizado o teste t de Student, pela ANOVA. Os dados de CCS e duração de casos clínicos de mastite foram transformados em Log₁₀CCS

para que os mesmos adquirissem distribuição normal. As médias de recidivas de casos clínicos por animal e por grupo não adquiriram distribuição normal quando transformados em Log₁₀. Por isso, foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

As frequências de microrganismos e de mastite subclínica na secagem e pós-parto foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado e a interação entre estes fatores foram analisados pelo Teste de McNemar. As taxas de concepção e prenhez foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prevalência de infecções intramamárias na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas

Algumas amostras de leite para análise microbiológica e contagem de células somáticas foram perdidas ao longo do experimento durante envio das amostras ao laboratório e devido à dificuldade de obtenção de amostra suficiente para realização das análises, especialmente de vacas na secagem. Para realização do teste de McNemar os animais que não possuíam amostras nos dois momentos, secagem e parto, foram descartados com o intuito de facilitar a leitura e interpretação dos dados, sem prejudicar a análise dos mesmos, visto que o teste só utiliza dados pareados para a análise estatística.

A prevalência de infecções intramamárias na secagem e no parto em vacas vacinadas e não vacinadas encontra-se descrita na tabela 3.

Tabela 3: Prevalência de infecções intramamárias na secagem e no parto em vacas vacinadas e não vacinadas

Grupo	Microrganismo											
	Coliformes				Outros				Negativo			
	SEC ¹	%	Parto	%	SEC	%	Parto	%	SEC	%	Parto	%
(n)		(n)		(n)		(n)		(n)		(n)		
Vacinado (n=34)	2	5,88	3	8,82	21 B	61,76	9 A	26,47	11 B	32,35	22 A	64,71
Não vacinado (n=41)	6	14,63	3	7,32	26 B	63,41	12 A	29,27	9 B	21,95	26 A	63,41

¹ SEC = Secagem

A,B Frequências seguidas de letras maiúscula distintas, na mesma linha, indicam diferenças estatísticas entre secagem e pós-parto, entre grupos e entre microrganismo, pelo teste McNemar ($p < 0,05$)

Não houve diferença estatística, entre colunas, pelo teste Qui-quadrado ($p > 0,05$)

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos vacinado e não vacinado quanto à frequência de resultados positivos para coliformes e outros microrganismos e resultados negativos, na secagem e no pós-parto. Não houve diferença na frequência de animais positivos para coliformes entre a secagem e o parto ($p > 0,05$). Tanto no grupo vacinado, quanto no grupo não vacinado, a frequência de resultados positivos para outros microrganismos que não os coliformes foi maior na secagem do que no pós-parto ($p < 0,05$). A frequência de amostras negativas aumentou da secagem para o pós-parto ($p < 0,05$), em ambos os grupos.

A prevalência de microrganismos na secagem e no pós-parto foi analisada objetivando a comparação entre os períodos e entre os grupos, vacinado e não vacinado, nos mesmos períodos. Em ambos os grupos houve aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de animais com resultados negativos entre a secagem e o pós-parto, sendo este aumento de 32,36 pontos percentuais para o grupo vacinado e 41,46 pontos percentuais para o grupo não vacinado, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$). O número de animais

positivos para outros microrganismos que não os coliformes foi menor entre a secagem e o parto para os dois grupos ($p < 0,05$), sendo esta redução para o grupo vacinado de 35,29 pontos percentuais e para o grupo não vacinado de 34,14 pontos percentuais. A redução na prevalência de animais infectados por outros microrganismos que não coliformes, e o conseqüente aumento nos animais com amostras de leite negativas ao parto no atual estudo foi atribuída, em grande parte, ao efeito do tratamento com antibiótico intramamário de longa ação utilizado nas vacas no momento da secagem, ou seja, a terapia de vacas secas. Tal fato evidencia a importância desta conduta na resolução de infecções pré-existentes no momento da secagem e na prevenção de novas infecções durante o período seco, principalmente contra patógenos que não os coliformes e está de acordo com os achados de vários autores (Bradley e Green, 2001b; Berry e Hillerton, 2002; Halassa et al., 2009b; Sampimon et al., 2009). Outro fato que poderia explicar o aumento de animais com amostras de leite negativas, no parto, encontrado neste estudo é que durante o período seco as secreções mamárias estão reduzidas, os componentes de defesa

antibacteriano, como a lactoferrina e fagócitos, estão elevados e o tampão de queratina é formado, tornando este um momento desfavorável para a sobrevivência e crescimento bacteriano na glândula mamária (Nickerson, 1989; Burvenich et al., 2000). Apesar disso, o período seco é considerado período de grande importância para aquisição de novas infecções intramamárias por patógenos ambientais, em especial pelos coliformes (Bradley e Green, 2000).

No presente estudo, não houve diferença na prevalência de animais positivos para coliformes na secagem e no pós-parto ($p>0,05$). No grupo vacinado duas vacas (5,88%) apresentaram-se infectadas por coliformes na secagem e três no pós-parto (8,82%). No grupo não vacinado, seis animais (14,63%) apresentavam-se infectados por estes microrganismos na secagem e três animais (7,32%) no pós-parto. Esse fato evidencia que a terapia de vacas secas não teve efeito na prevalência de animais positivos para coliformes no parto. Os produtos utilizados para a terapia de vacas secas normalmente contêm antibióticos com predomínio de espectro contra bactérias gram-positivas, sendo esta uma das razões para não apresentar efeito sobre as infecções por coliformes (Bradley e Green, 2001b; Halassa et al., 2009b; Sampimon et al., 2009). Berry e Hillerton (2002) demonstraram que mesmo quando antibiótico de amplo espectro foi utilizado na terapia de vacas secas, nenhum efeito foi observado na prevenção de novas infecções por coliformes. Além disso, o final do período seco é um dos momentos críticos para a aquisição de novas infecções por

estes patógenos, momento este que a terapia de vacas secas não fornece proteção plena contra novas infecções intramamárias devido à baixa concentração do antibiótico na glândula mamária (Halassa et al., 2009b).

Assim como no presente estudo, outros autores não encontraram diferença na prevalência de infecções por coliformes no pós-parto entre animais vacinados e não vacinados e justificaram este fato pela dinâmica da infecção causada por estes microrganismos que é caracterizada por elevadas taxas de cura e reinfeção. Estes estudos demonstraram que o principal efeito da vacina é a redução na duração e na severidade dos casos clínicos causados por estas infecções (Hogan et al., 1992a; Hogan et al., 1995). Gentilini (2010) utilizando um protocolo de vacinação iniciado na data da secagem, a segunda dose 30 dias após a primeira e a terceira aos 7 dias pós-parto, observou uma redução significativa ($p<0,05$) na prevalência de infecções intramamárias por *E. coli* no pós-parto no grupo de vacas vacinadas (8,33%) em comparação a vacas não vacinadas (4,29%). O rebanho, a época de realização do experimento e o esquema de vacinação utilizados pela autora foram diferentes do utilizado no atual estudo, o que pode explicar as diferenças encontradas.

4.2 Ocorrência de casos clínicos de mastite

A tabela 4 apresenta as médias de animais no grupo vacinado e não vacinado que apresentaram mastite clínica nos primeiros 100 dias de lactação, o número de episódios clínicos e a duração destes.

Tabela 4: Ocorrência e duração de episódios clínicos de mastite nos primeiros 100 dias pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas

Grupos	Mastite clínica			
	Duração (dias)/animal com caso clínico*	Número de animais com episódio clínico/total de animais no grupo**	Número de episódios/animal com caso clínico**	Número de episódios/total de animais no grupo**
Vacinado (n=43)	10,2 a	0,26 (11/43)	2,2 (24/11)	0,6 (24/43)
Não vacinado (n=50)	12,9 b	0,32 (16/50)	2,6 (41/16)	0,8 (41/50)

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre duração, pela ANOVA, teste t ($p < 0,05$)

**Não houve diferença estatística pelo teste Mann-Whitney ($p > 0,05$)

A média de duração do total de casos clínicos apresentado por cada animal que apresentou episódio clínico de mastite até 100 dias de lactação foi menor ($p < 0,05$) no grupo vacinado em comparação aos animais do grupo não vacinado, sendo esta duração de 10,2 dias e 12,9 dias, respectivamente. No grupo vacinado, 11 animais apresentaram casos clínicos de mastite no total de 24 episódios no grupo. A média de episódios clínicos por animal com mastite clínica no grupo vacinado foi de 2,2. No grupo não vacinado, 16 animais apresentaram 41 episódios clínicos, sendo a média de 2,6 episódios por animais que apresentaram caso clínico de mastite. Essas médias não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). O número de episódios clínicos em relação ao total de animais no grupo vacinado e não vacinado foi de 0,6 no grupo vacinado e 0,8 no grupo não vacinado, não sendo diferentes entre os grupos ($p > 0,05$).

Apenas um animal do grupo vacinado apresentou mastite clínica Grau 2, sendo os demais episódios clínicos apresentados Grau 1, tanto no grupo vacinado quanto no não vacinado. Hogan et al. (1995), também, não encontraram diferença na ocorrência de manifestação sistêmica dos casos clínicos. Os autores atribuíram este fato a cepa de *E. coli* utilizada para desafiar os animais, que causa casos clínicos leves de mastite e citam que o modelo utilizado pareceu refletir com maior precisão a dinâmica

natural da ocorrência de infecções intramamárias e casos clínicos de mastite causada por coliformes. Embora neste estudo não tenha sido realizada a identificação da cepa de coliformes presente na propriedade, é possível tratar-se de uma cepa menos virulenta. A adequada condição nutricional dos animais pode ainda ter contribuído para a não observação de casos clínicos sistêmicos nos animais.

A redução na duração dos casos clínicos no grupo vacinado observada neste estudo também foi observada em estudo realizado por Hogan et al (1995). Os autores demonstraram que a redução na duração média dos episódios clínicos de mastite foi de 2,1 dias e que não houve diferença nos sinais clínicos entre os grupos. Os autores citam que a vacinação com *E. coli* J5 não previne infecções por coliformes, mas reduz a duração dos sinais clínicos em vacas imunizadas devido à rápida supressão do crescimento de bactérias. A habilidade da vaca de defender contra infecção intramamária por *E.coli* parece estar relacionada com a velocidade com que os neutrófilos podem ser mobilizados do sangue para a glândula mamária e a opsonização na glândula mamária, sendo o aumento da resposta imune associado ao aumento da IgG em animais vacinados (Hogan et al., 1992c). Os níveis séricos de IgG1 e IgG2 são maiores nos animais vacinados do que nos animais controles. Já estes animais apresentam níveis mais

elevados de IgM. Essa mudança na produção de classe de imunoglobulinas em animais imunizados tem sido relatada como componente chave na eficácia da defesa do hospedeiro, principalmente relacionada a IgG2. Esta imunoglobulina é um importante anticorpo opsonizante que auxilia a fagocitose de bactérias por neutrófilos, favorecendo a resposta imunológica do tipo Th1, sendo este um dos principais benefícios da vacina *E. coli* J5 (Wilson et al., 2007). A resposta imune em vacas no início da lactação é do tipo Th2, enquanto que no final da lactação é do tipo Th1, o que pode ser associado à maior proteção contra mastite por coliformes. Uma rápida disponibilidade de IgG2 contra J5 imediatamente após as bactérias entrarem na glândula mamária tem sido associada a depuração mais efetiva das bactérias coliformes da glândula mamária, que em animais não vacinados ocorre mais tardiamente (Shafer-Weaver et al., 1999). Com a redução de dois dias na duração dos casos clínicos de mastite em animais vacinados observada neste estudo, reduz-se o gasto com medicamentos e mão-de-obra para tratamento do caso clínico e as perdas com descarte de leite.

No grupo vacinado (n=43) 11 animais (25,6%) e no grupo não vacinado (n=50) 16

animais (32%) apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação, não sendo esta ocorrência diferente ($p>0,05$) entre os grupos. Wilson et al. (2007) utilizando protocolo de vacinação iniciado na secagem e a segunda dose no intervalo de 21 a 28 dias, concluíram que a vacinação com J5 não foi associada com redução na ocorrência de mastite clínica por coliformes. Entretanto, Gentilini (2010) em estudo utilizando 3 doses da vacina, sendo a primeira dose da vacina na secagem, a segunda dose 30 dias após a primeira e a terceira na primeira semana após o parto, observou que os animais não vacinados apresentaram maior ocorrência de mastite clínica (36,26%) nos primeiros 100 dias de lactação, em comparação com o grupo vacinado (20,83%). Estes dados indicam que uma dose da vacina no pós-parto pode auxiliar na redução dos casos clínicos de mastite.

4.3 Contagem de células somáticas

A prevalência de mastite subclínica na secagem e no pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas é apresentada na tabela 5.

Tabela 5: Prevalência de mastite subclínica na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas

Grupos	Com Mastite Subclínica			
	SEC ¹ (n)	%	Parto (n)	%
Vacinado (n=35)	25 B	71,43(25/35)	9 Aa	25,71 (9/35)
Não vacinado (n=42)	36 B	85,71 (36/42)	22 Ab	52,38 (22/42)

¹ SEC = Secagem

A, B Freqüências seguidas de letras maiúscula distintas, na mesma linha, indicam diferenças estatísticas entre secagem e parto, entre animais com mastite subclínica, pelo teste McNemar ($p<0,05$)

a, b Freqüências seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, indicam diferenças estatísticas, entre grupos, pelo teste Qui-quadrado ($p<0,05$)

Não houve diferença na prevalência de animais com mastite subclínica na secagem

entre os dois grupos ($p>0,05$). Houve redução do número de animais que

apresentaram mastite subclínica entre a secagem e o parto nos dois grupos ($p < 0,05$). Esta redução foi de 45,72 pontos percentuais para o grupo vacinado e de 33,33 pontos percentuais para o grupo não vacinado. No parto, a prevalência de animais que apresentaram mastite subclínica foi menor no grupo vacinado ($p < 0,05$) em relação ao grupo não vacinado, sendo 9 animais (25,71%) no grupo vacinado que apresentaram mastite subclínica e 22 no grupo não vacinado (52,38%).

A principal justificativa para a redução no número de animais com mastite subclínica entre a secagem e o parto foi a utilização da terapia de vacas secas. Associado a isso, a glândula mamária durante o período se torna um ambiente desfavorável para a sobrevivência e crescimento bacteriano (Nickerson, 1989; Burvenich et al., 2000). No parto, o grupo vacinado apresentou menor número de animais com mastite subclínica em comparação aos animais não vacinados o que pode ser atribuído ao efeito benéfico da vacina na prevenção de novas infecções, durante o período seco. A reação inflamatória da glândula mamária após a invasão de bactérias Gram-negativas é geralmente associada à rápida proliferação bacteriana no leite, ativação de várias reações inflamatórias com conseqüente produção de citocinas e migração massiva de anticorpos e neutrófilos do sangue para o

leite com o intuito de eliminar a infecção (Riollet et al., 2000). A rápida migração de neutrófilos para a glândula mamária elimina os microrganismos causadores de mastite, e os produtos resultantes desta infecção, como elevada CCS e presença de alterações no leite, ainda permanecem até que a recuperação da glândula mamária seja estabelecida (Radostits et al., 1999). Além disso, muitas infecções intramamárias causadas por coliformes existem com menos que 100 unidades formadoras de colônias (UFC / mL), sendo este o limite mínimo de detecção quando o método padrão é utilizado, semeando 0,01 mL de leite em ágar sangue (Smith, 1983). Portanto, não são raros os diagnósticos negativos em que há presença de infecções por coliformes. No presente estudo, em que mesmo não sendo observada diferença quanto à prevalência de infecções intramamárias entre os grupos vacinado e não vacinado pela análise microbiológica, houve diferença quanto a ocorrência de mastite subclínica observada pela análise de CCS. Tal fato indica a importância de associar a cultura microbiológica com análise de CCS para maior acurácia no diagnóstico das mastites bovinas.

A tabela 6 apresenta a média da contagem de células somáticas nos animais do grupo vacinado e não vacinado na secagem e após o parto até os 100 primeiros dias de lactação.

Tabela 6: Média da contagem de células somáticas na secagem e nos 100 primeiros dias após o parto (\log_{10} células/mL), nos grupos vacinados e não vacinados

Grupos	Variáveis			
	CCS SEC ¹ (células/mL)	Erro Padrão	CCS PP ² (células/mL)	Erro Padrão
Vacinado	5,71 a	0,09	5,09 a	0,09
Não vacinado	6,00 b	0,09	5,38 b	0,09

¹SEC = secagem

²PP = pós-parto

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, indicam diferenças estatísticas, entre CCS, pelo procedimento Mixed do SAS, teste t ($p < 0,05$)

Em vacas vacinadas, a CCS foi significativamente menor (LogCCS = 5,71) no dia da secagem, quando comparada ao grupo não vacinado (LogCCS = 6,00) ($p < 0,05$). As vacas vacinadas apresentaram menor CCS em relação aos animais não vacinados nos primeiros 100 dias de lactação, sendo o logCCS 5,38 e logCCS 5,09, respectivamente ($p < 0,05$). Esta contagem representa a média de três coletas intervaladas de 30 dias. A contagem de células somáticas não foi diferente entre secagem e a média dos 100 primeiros dias de lactação em cada grupo ($p > 0,05$).

A diferença observada entre os dois grupos pode ser explicada pelo mecanismo de ação da vacina *E. coli* J5 sugerido por Dosogne et al. (2002) e Hogan e Smith (2003) no qual a proteção oferecida pela vacina está relacionada ao aumento na produção de anticorpos específicos contra antígenos do núcleo do LPS e aumento na opsonização de bactérias. Os títulos séricos de IgG1 e IgG2 contra *E. coli* J5 são significativamente maiores em vacas vacinadas, comparadas as não vacinadas (Wilson et al., 2007b), o que favorece a formação da resposta imunológica Th1 auxiliando na fagocitose da bactéria pelo neutrófilo e eliminação da infecção (Burton et al., 2003). Com isso a eliminação da infecção pelo grupo vacinado é mais rápida (Wilson et al., 2007b). Estes autores observaram que a CCS de animais vacinados após 60 horas do desafio intramamário com *E. coli* era 300.00 céls./mL e do não vacinado estava entre 1.000.000 céls./mL e 2.000.000 céls./mL. Os resultados observados no presente estudo foram semelhantes aos descritos por esses autores, indicando o benefício da vacina na redução da intensidade da reação inflamatória da glândula mamária. Este benefício pôde ser observado desde a secagem, ou seja, 15 dias após a aplicação da primeira dose da vacina. Wilson et al.

(2009) relataram que os efeitos da vacina desapareceram aos 75 dias de lactação, ou seja, aproximadamente 100 dias após a última aplicação. Os autores citam que este fato pode estar relacionado à falta de memória imunológica de longo prazo associada a esta vacina após aplicação de duas doses. No presente estudo, houve diferença na CCS entre os grupos vacinados e não vacinados durante os primeiros 100 dias de lactação, indicando que a utilização de um protocolo de vacinação com 3 doses pode ser benéfica.

Pantoja et al. (2009) concluíram que quartos com CCS > 200.000 células/mL na secagem e no pós-parto foram 2,7 vezes mais propensos a desenvolverem quadros clínicos de mastite na lactação seguinte do que quartos com CCS < 200.000 células/mL nos dois períodos. No atual estudo a vacinação resultou em redução na CCS de vacas na secagem e no pós-parto. Estes dados indicam a importância de um protocolo de vacinação iniciado antes da secagem, resultando na redução da CCS dos animais na secagem e pós-parto, podendo-se, então, obter animais menos propensos a desenvolverem quadros clínicos na lactação seguinte. No presente estudo, não foi observado um menor número de animais apresentando episódios clínicos no grupo vacinado, apesar da diminuição da CCS dos animais, provavelmente porque esta ainda se apresentava superior aos valores considerados por esses autores, tanto na secagem quanto no pós-parto, mesmo para o grupo vacinado.

4.4 Produção de leite

A tabela 7 mostra a produção de leite nos primeiros 100 dias de lactação nas vacas do grupo vacinado e não vacinado.

Tabela 7: Produção de leite (Kg de leite/vaca/dia) de vacas vacinadas e não vacinadas nos primeiros 100 dias de lactação

Grupos	Produção PP* (Kg leite/vaca/dia)	Erro Padrão
Vacinado (n=43)	25,96	0,83
Não vacinado (n=50)	25,66	0,87

*PP = pós-parto

Não houve diferença estatística pelo procedimento Mixed do SAS, teste t ($p < 0,05$)

Não houve diferença ($p > 0,05$) na média da produção de leite até os 100 dias de lactação, entre os animais vacinados e não vacinados (tabela 7). Estes resultados estão de acordo com Hogan et al. (1995) que concluíram que a produção de leite não diferiu entre os grupos experimentais após o desafio intramamário com *E. coli*. Os autores demonstraram que a média na produção de leite diminuiu aproximadamente 35% no dia seguinte ao desafio, nos dois grupos e retornou ao nível de produção anterior ao desafio quatro dias após o mesmo. Quando a infecção intramamária ocorre, o processo inflamatório gerado provoca danos no tecido secretor, resultando em menor produção de leite (Shuster et al. 1991). Danos causados as células epiteliais e a glândula mamária decorridos da infecção podem ser reparados após a eliminação do patógeno e a redução do processo inflamatório e a função da parte afetada pode retornar ao normal na mesma lactação (Harmon, 1994). A duração dos casos clínicos no grupo vacinado e a CCS foram menores neste estudo, o que indica menor reação inflamatória e supostamente menor dano ao tecido secretor.

Wilson et al. (2009) estudaram a ocorrência de casos naturais de mastite clínica em animais vacinados e não vacinados em rebanhos comerciais dos Estados Unidos e observaram que vacas do grupo vacinado que desenvolveram casos clínicos de mastite apresentaram média diária de produção de leite maior que as vacas do

grupo não vacinado, sendo esse aumento na média de 2 kg de leite/dia. No presente estudo não houve diferença na produção de leite entre os grupos indicando que o intervalo de 30 dias entre pesagem pode impedir a detecção de diferenças na produção de leite nos animais vacinado e não vacinado. Gentilini (2010), após a aplicação de três doses da vacina *E. coli* J5 em vacas na secagem, 30 dias após a primeira aplicação e a terceira dose na primeira semana após o parto, observou que a média de produção de leite foi inferior nas vacas não vacinadas (21,26Kg/vaca/dia) do que nas do grupo vacinado (22,79Kg/vaca/dia) nos primeiros 100 dias de lactação. Wilson et al. (2007 e 2008) verificaram que vacas vacinadas com *E. coli* J5 reduziram a perda de produção de leite seguida a ocorrência de caso clínicos de mastite, utilizando duas doses da vacina, sendo a primeira na secagem e a segunda 21 a 28 dias após o primeiro. Os protocolos de vacinação utilizados nos trabalhos referenciados distinguem do utilizado no atual estudo. Petersson et al. (2002) utilizaram um protocolo de vacinação semelhante ao utilizado no presente estudo, sendo a primeira dose da vacina 15 dias antes da secagem, a segunda dose na secagem e a terceira 30 dias após a segunda. Os autores não observaram diferença entre os grupos na produção de leite e atribuíram este fato a realização do estudo em vacas no início da lactação, momento este em que a produção de leite está aumentando rapidamente e o efeito do

esquema de vacinação neste parâmetro pode não ser observado.

4.5 Reprodução e Mastite

O número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-

parto em animais dos grupos vacinados e não vacinados encontra-se descrita na tabela 8.

Tabela 8: Número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-parto em animais dos grupos vacinados e não vacinados

Grupo	Nº de animais inseminados até 100 dias de lactação**	Nº de animais prenhes ao primeiro serviço**	Nº de animais prenhes até 100 dias de lactação**
Vacinado (n=43)	40 (40/43)	12 (12/40)	19 (19/43)
Não vacinado (n=50)	49 (49/50)	13 (13/49)	21 (21/50)

**Não houve diferença estatística pelo teste de Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Das 93 vacas, 89 tiveram pelo menos uma inseminação nos primeiros 100 dias de lactação. A taxa de concepção na primeira inseminação foi de 30,0% (12/40) para o grupo de animais vacinados e de 26,5% (13/49) para os animais não vacinados, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$). A taxa de prenhez foi de 44,2% (19/43) para o grupo vacinado e de 42,0% (21/50) para o grupo não vacinado, não sendo diferente ($p > 0,05$) entre os grupos. Wilson et al. (2008) estudando a associação entre a utilização da vacina J5 e o desempenho reprodutivo seguido da ocorrência de casos de mastite clínica, relataram que no grupo controle 73,5% das vacas ficaram prenhes e no grupo vacinado 68,9% das vacas, não havendo diferença entre os grupos. Embora, no presente estudo, a vacina tenha reduzido a duração média dos casos clínicos nos animais que apresentaram mastite clínica,

não houve diferença no número de animais que apresentaram mastite clínica nos grupos vacinados e não vacinados. Este fato pode justificar a não ocorrência de diferença na taxa de concepção ao primeiro serviço entre os grupos.

A tabela 9 apresenta o número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-parto em animais com mastite e sem mastite clínica.

Tabela 9: Número de animais inseminados e prenhes até 100 dias de lactação e o número de animais prenhes ao primeiro serviço pós-parto em animais com mastite e sem mastite clínica

Grupo	Nº de animais inseminados até 100 dias de lactação **	Nº de animais prenhes ao primeiro serviço	Nº de animais prenhes até 100 dias de lactação
Com mastite (n=27)	26 (26/27)	3 (3/26) b	7 (7/27) b
Sem mastite (n=66)	63 (63/66)	22 (22/63) a	33 (33/66) a

**Não houve diferença estatística pelo teste de Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Frequências seguidas de letras minúsculas, entre linhas, indicam diferença estatística, entre grupos, pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Dos 26 animais que apresentaram mastite e foram inseminados nos 100 primeiros dias de lactação, três ficaram prenhes na primeira inseminação, sendo a taxa de concepção na primeira inseminação de 11,54%. Para o grupo sem mastite, dos 63 animais inseminados, 22 tornaram-se prenhes na primeira inseminação, sendo a taxa de concepção de 34,90%. Sendo assim, os animais sem mastite clínica nos primeiros 100 dias de lactação apresentaram maior taxa de concepção à primeira inseminação ($p < 0,05$) do que o grupo com mastite clínica. A taxa de prenhez nos 100 primeiros dias de lactação foi de 25,9% (7/27) para os animais que apresentaram mastite clínica e 50% (33/66) para os animais que não apresentaram episódio clínico de mastite.

O resultado encontrado neste estudo está de acordo com Hertl et al. (2010) que observaram redução média na taxa de concepção de 52% em vacas que apresentaram mastite clínica. A menor probabilidade de concepção foi associada com a ocorrência de mastite clínica imediatamente após a inseminação artificial, sendo o intervalo de 14 dias antes e 35 dias após a inseminação o mais afetado. Wilson et al. (2008) verificou que as vacas com mastite eram menos propensas a se tornarem prenhes (47%) do que as controles (78%) e que a mastite clínica causada por *Escherichia coli* e *Streptococcus sp* foi associada com 50% menos probabilidade de concepção do que

para os demais patógenos causadores de mastite. O fragmento do componente da parede celular de patógenos gram-positivos, o peptidoglicano, pode produzir respostas que são semelhantes à infusão intramamária de endotoxina e a mastite causada por coliformes (Barker et al., 1998). A resposta imune a infecção do tipo Th1 envolve a produção de linfócitos que secretam citocinas pró-inflamatórias prejudiciais à manutenção da prenhez (Shafer-Weaver, et al. 1999). Estas estimulam a produção de PGF2 α que interage com receptores no corpo lúteo e bloqueia a síntese de progesterona, o que resulta em luteólise e conseqüente regressão luteal, influenciando na concepção e comprometendo o desenvolvimento e sobrevivência embrionária precoce, e todo o desempenho reprodutivo (Barker et al., 1998; Hockett et al. 2000). Esses achados justificam o resultado encontrado no presente estudo, pois no grupo de animais que apresentaram caso clínico, independente do agente causador da mastite, houve uma redução na taxa de concepção a primeira inseminação de 23,4 pontos percentuais.

5 CONCLUSÕES

A vacinação de vacas com *E. coli* J5 no período pré-parto melhora a saúde da glândula mamária de vacas leiteiras reduzindo a prevalência de animais com

mastite subclínica no pós-parto, bem como a duração dos casos clínicos de mastite e a contagem de células somáticas na secagem e nos 100 primeiros dias de lactação.

A produção de leite, a ocorrência de casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação e a eficiência reprodutiva não são alteradas pela utilização da vacina *E. coli* J5.

A ocorrência de mastite clínica tem efeito negativo sobre a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.K.; KINDAHL, H.; SMITH, R.A.; et al. Endotoxin-induced bovine mastitis: arachidonic acid metabolites in milk and plasma and effect of flunixin meglumine. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.1373–1377, 1986.
- BANNERMAN, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, v.87, p.10-25, 2009.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M.; et al. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.411–419, 1998.
- BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; et al. Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.1285–1290, 1998.
- BATTAGLIA, D.F.; BOWEN, J.M.; HOLLY B. KRASA, H.B.; et al. Endotoxin Inhibits the Reproductive Neuroendocrine Axis While Stimulating Adrenal Steroids: A Simultaneous View from Hypophyseal Portal and Peripheral Blood. *Endocrinology.*, v.138, n.10, p.4273-4281, 1997.
- BERRY, E.A. e HILLERTON, J.E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.112–121, 2002.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.*, v.164, p.116–128, 2002.
- BRADLEY, A.J. e GREEN, M.J. An Investigation of the Impact of Intramammary Antibiotic Dry Cow Therapy on Clinical Coliform Mastitis. *J. Dairy Sci.* v. 84, p.1632–1639, 2001b.
- BRADLEY, A.J. e GREEN, M.J. Coliform mastitis - the importance of the dry period. IN: PROCEEDINGS BRITISH MASTITIS CONFERENCE, Institute for Animal Health/Milk Development Council, Shepton Mallet, p.28-36, 2000.
- BRADLEY, A. J. e GREEN, M. J. The aetiology of clinical mastitis in a cohort of Somerset dairy herds. *Vet. Rec.* p.683-686, 2001a
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; *Diagnóstico microbiológico da mastite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).
- BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulasepositivo isolados de mastite bovina. *Ciê. Rur.*, v.32, n.1, p.79-82, 2002.
- BURTON, J.L.; CHAIYOTWITTAYAKUN, A.; SMITH, K.; et al. Novel applications for coliform vaccine programs. IN: PROCEEDINGS OF THE 41st ANNUAL MEETING OF THE

- NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Orlando, FL, p.89-110, 2002.
- BURTON, J.L. e ERSKINE, R.J. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.19, p.1-45, 2003.
- BURVENICH, C.; BANNERMAN, D. D.; LIPPOLIS, J. D.; et al. Cumulative Physiological Events Influence the Inflammatory Response of the Bovine Udder to *Escherichia coli* Infections During the Transition Period. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.E39-E54, 2007.
- BURVENICH, C.; DETILLEUX, J.; PAAPE, M.J.; et al. Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. IN: PROCEEDINGS SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY OF RUMINANT MAMMARY GLAND, 2000, Stresa- Itália, p.9-20, 2000.
- BURVENICH, C.; VAN, V.; JALIL, M.; et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.*, v.34, p.521-564, 2003.
- CALLAWAY, T.R.; ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; et al. Forage Feeding to Reduce Preharvest *Escherichia coli* Populations in Cattle, a Review. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.852-860. 2003.
- CARAMBULA, S.F.; MAITIKAINEN, T.; LYCH, M.P.; et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. *Endocrinology*, v.143, n.4, p.495-501, 2002.
- CHANETON, L.; TIRANTE, J.; MAITO, J.C.; BUSSMANN, L.E.. Relationship Between Milk Lactoferrin and Etiological Agent in the Mastitic Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.1865-1873, 2008.
- CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.; REYNOLDS, J.P.; et al. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* v.84, p.239-255, 2004.
- COMALLI, M.P; EBERHART R..J; GRIEL LC JR, et al. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *Am J Vet Res.*, v.45, p.2236-2242, 1984.
- CULLOR, J.S. Mastitis and its influence upon reproductive performance in dairy cattle. IN: PROC. INT. SYMP. BOVINE MASTITIS, Indianápolis, EUA, p.176, 1990.
- CUNHA, R.P.L. Ocorrência de Mastite Subclínica em Animais da Raça Holandesa em Regiões do Estado de Minas Gerais e a Relação da Contagem de Células Somáticas com Número de Lactações, Estação do Ano, Produção e Composição Química do Leite. 2005, 45p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- DETILLEUX, J.C.; KHERLI, M.E.; STABEL, J.R.; et al. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.44, p.251-267, 1995.
- DINGWELL, R.T.; LESLIE, K.E.; SCHUKKEN, Y.H.; et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Prev. Vet. Med.*, v.63, p.75-89, 2004.
- DOHOO, I.R.; e MEEK, A.H. Somatic Cell Counts in Bovine Milk. *Can. vet. J.*, v.23, p.119-125, 1982.

- DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against bovine coliform mastitis. *Vet. Res.*, v. 33, p.1-12, 2002.
- EBERHART, R.J. Management of dry cows to reduce mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.69, p.1721-1732, 1986.
- EBERHART, R.J.; NATZKE, R.P.; NEWBOULD, F.S.H.; et al. Coliform mastitis – a review, *J. Dairy Sci.*, v.62, p.1–22, 1979.
- ELBIEN, A. D.; e HEATH. E. C. The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*: I. The biochemical properties of a uridine diphosphate galactose 4-epimeraseless mutant. *J. Biol. Chem.*, v. 240, n.5, p.1926-1931, 1965.
- FREITAS, D.S. Uso de um inibidor da síntese de prostaglandinas sobre a taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de manipulação cervical, 2007, 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.
- GENTILINI, M.B. Utilização da vacina *Escherichia coli* J5 na imunização de vacas e novilhas leiteiras contra mastites causadas por *Escherichia coli.*, 2010, 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- GILBERT, R.O.; BOSU, W.T.K.; PETER, A.T. The effect of *Escherichia coli* endotoxin on luteal function on Holstein heifers. *Theriogenology*, v.33, p.645–651, 1990.
- GOFF, J.P. e HORST, R.L. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.1260–1268, 1997.
- GONZALEZ, R.N.; CULLOR, J.S.; JASPER, D.E.; et al. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can. J. Vet. Res.*, v.53, p.301-305, 1989.
- GREEN, M. J. e BRADLEY, A. J. Coliform mastitis—an evolving problem. *Cattle Practice*, v.6, p.91–94, 1998.
- GREEN, M.J.; GREEN, L.E.; MEDLEY, G.F. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, vol85, p.2589-2599, 2002.
- GREEN, M.J.; GREEN, L.E.; SCHUKKEN, Y.H.; et al. Somatic Cell Count Distributions During Lactation Predict Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1256–1264, 2004.
- GRÖHN, Y.T.; WILSON, D.J.; GONZÁLEZ, R.N.; et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.3358-3374, 2004.
- GUNAY, A.; GUNAY, U. Effects of Clinical Mastitis on Reproductive Performance in Holstein Cows. *Acta Vet.Brno.*, v.77, p.555-560, 2008.
- HAGNESTAM-NIELSEN, C.; EMANUELSON, U.; BERGLUND, B.; STRANDBERG, E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p.3124–3133, 2009.
- HALASA, T.; NIELEN, M.; DE ROOS, A.P.W.; et al. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.599–606, 2009a.

- HALASA, T.; NIELEN, M.; VAN WERVEN, T.; HOGEVEEN, H.; ØSTERÅS, O. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.3134–3149, 2009b.
- HANSEN, P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle - Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.51, p.294–301, 2004.
- HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E.; et al. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection*. Arlington: NMC, 1990, 34p.
- HARMON, R.J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2103-2112, 1994.
- HARMON, R.J. Somatic Cell Counts: A Primer. IN: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING PROCEEDINGS (2001). Disponível em: National Mastitis Council Web Site - www.nmconline.org Acessado em 20 de abril de 2011.
- HASS, Y.; VEERKAMP, R.F.; BARKEMA, H.W.; et al. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J. Dairy Sci.*, v.87, p. 95-105, 2004.
- HERTL, J.A.; GRÖHN, Y.T.; LEACH, J.D.G.; et al. Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.1551–1560, 2010.
- HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C.; VERCAUTEREN, R. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leucocytes and experimentally induced *E.coli* mastitis in cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.985-994, 1990.
- HILL, A.W. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Res. Vet. Sci.*, v.31, p.107–112, 1981.
- HILL, A.W.; HENEGHAN, D.J.S.; WILLIAMS, M.R. The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, v.8, p.293–300, 1983.
- HOCKETT, M.E.; HOPKINS, F.M.; LEWIS, M.J.; et al. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *An. Reprod. Sci.*, v.58, p.241–251, 2000.
- HOCKETT, M.E.; ALMEIDA, R.A.; ROHRBACH, N.R.; et al. Effects of Induced Clinical Mastitis During Preovulation on Endocrine and Follicular Function. *J. Dairy Sci.*, v.88, p.2422–2431, 2005.
- HOGAN, J.S.; BOGACZ, V.L.; ASLAM, M.; SMITH, K.L. Efficacy of an *Escherichia Coli* J5 bacterin administered to Primigravid Heifers. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.939-943, 1999.
- HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. *Vet. Res.*, v. 34, p.507-519, 2003.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H.; et al. Field survey of mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1547–1556, 1989.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A. Virulence factors of coliform bacteria, IN: COLIFORM MASTITIS SYMPOSIUM, 1993, Trenton,

- New Jersey. Veterinary Learning Systems, 1993. p.36–40.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.78–84, 1992a.
- HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; TOMITA, G.M.; et al. Oponic activity of bovine serum and mammary secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.72–77, 1992b.
- HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; TODHUNTER D.A.; et al. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.415-422, 1992c.
- HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L.; et al. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.285–290, 1995.
- HORTET, P.; BEAUDEAU, F., SEEGER, H.; FOURICHON, C. Reduction in milk yield associated with somatic cell counts up to 600.000 cells/mL in French Holstein cows without clinical mastitis. *Livest. Prod. Sci.*, v.61, p.33-42, 1999.
- HYVÖNEN, P. Lactoferrin in Bovine Intramammary Infection., 2010, 78p. Dissertação (Mestrado in Animal Production) - University of Helsinki, Finland.
- HURLEY, W.L. Mammary gland function during involution. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1637-1646, 1989.
- HURLEY, W.L. e REJMAN, J.J. β -Lactoglobulin and α -lactalbumin in mammary secretions during the dry period: parallelism of concentration changes. *J. Dairy Sci.*, v.69, p.1642-1647, 1986.
- JONES, T.O. A review of teat factors in bovine *E. coli* mastitis. *Vet. Rec.*, v.118, p.507–509, 1986.
- JONES, G.M.; PEARSON, R.E.; CLABAUGH, G.A.; HEALD, C.W.. Relationships Between Somatic Cell Counts and Milk Production. *J. Dairy Sci.*, v.67, p.1823-1831, 1984.
- LAVON, Y.; LEITNER, G.; VOET, H.; WOLFENSON, D. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.911–921, 2010.
- LEHTOLAINEN, T. *Escherichia coli* mastitis Bacterial factors and host response. 2004, 74p. Dissertação (Mestrado in Animal Production) - University of Helsinki, Finland.
- LEHTOLAINEN, T.; SUOMINEN, S.; KUTILA, T.; et al. Effect of intramammary *Escherichia coli* Endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v.86, p.2327-2333, 2003.
- LIN, J.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Growth responses of coliform bacteria to purified immunoglobulin G from cows immunized with ferric enterobactin receptor FepA. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.86–92, 1999.
- KEHRLI, I.K.L.; NONNECKE, E.B.J.; ROTH, J.A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.*, p.50:207, 1989.
- KEHRLI, M.E. e SHUSTER, D.E. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p.619-627, 1994.
- KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H.S. Milk immunoglobulins and

- complement factors. *British J Nutrit.*, v.84, suppl.1, p.S75-S80, 2000.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; SOMMER, H.M. The *Enterobacteriaceae*, in: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J.B. Lippincott Company, New York, New York, USA. p.57–124, 1983
- KUTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; SALONIEMI, H.; KAARTINEN, L. Antibacterial Effect of Bovine Lactoferrin Against Udder Pathogens. *Acta vet. Scand.*, v.44, p.35-42, 2003.
- MALLARD, B.A.; DEKKERS, J.C.; IRELAND, M.J.; et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.585-595, 1998.
- McCALLUS, D.E. e NORCROSS, N.E. Antibody Specific for Escherichia coli J5 Cross-React to Various Degrees with an Escherichia coli Clinical Isolate Grown for Different Lengths of Time. *Infection and immunity*, v.55, n.5, p.1042-1046, 1987.
- McDONALD, J.S.; e ANDERSON, A.J. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: The early nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.1360, 1981.
- MOORE, D.A.; O'CONNOR, M.L. Coliform mastitis: Its possible effects on reproduction in dairy cattle. IN: PROC. 32ND ANNU. MEET. NATL. MASTITIS COUNC., 1993, Kansas City, MO. *Natl. Mastitis Council, Inc.*, Arlington, VA., 1993, p.162–166.
- MORRISON, D.C.; e ULEVITCH, R.J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems: a review. *Am. I. Pathol.*, v.93, p.526-617, 1978.
- NAPEL, J.T.; HAAS, Y.; JONG, G.; et al. Characterization of distributions of somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.1253–1264, 2009.
- NATZKE, R.P. e LeCLAIR, B.J. Coliform contaminated bedding and new infections. *J. Dairy Sci.*, v.59, n.12, p.2152-2154, 1975.
- NICKERSON, S.C. Immunological aspects of mammary involution. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1665-1678, 1989.
- NMC. Current concepts of bovine mastitis. *National Mastitis Council, Inc.*, Madison WI., 47p., 1987.
- OLIVER, S.P. e BUSHE, T. Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during involution of the mammary gland: relation to secretion composition. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, p.1669–1673, 1987.
- OLIVER, S.P. e SORDILLO, L.M. Approaches to the manipulation of mammary involution. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1647-1664, 1989.
- OLIVER, S.P. e SORDILLO, L.M. Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.2584-2606, 1988.
- PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, v.34, p.597–627, 2003.
- PAAPE, M.J.; SCHULTZE, W.D.; DESJARDINS, C.; MILLER, R.H. Plasma corticosteroid, circulating leukocyte and milk somatic cell responses to *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.145, p.553–559, 1974.
- PANTOJA, J.C.F.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the

- subsequent lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.139–148, 2009.
- PARK, Y.H.; FOX, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIES, W.C. Bovine mononuclear leukocyte subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.998–1006, 1992.
- PETERSSON, C.S.; LESLIE, K.E.; KELTON, D.F.; et al. Impact of two coliform mastitis vaccination schedules on milk production and dry matter feed intake of dairy cattle. IN: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING PROCEEDINGS, Orlando, Florida. p.168–169, 2002.
- PETERSSON-WOLFE, C.S. Control of Mastitis during the Transition Period. IN: VIRGINIA TECH DAIRY CONFERENCE. Virginia, EUA, 2006.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C.; Vencendo a luta contra mastite. Naperville – IL: Westfalia Surge Inc., 2000, 192p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHDIFF, K.W. Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Elsevier, 1999. 185p.
- RIOLLET, C.P.; RAINARD, P.; POUTREL, B.; Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systematically immunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Inflamm. Res.*, v.49, p.486–496, 2000.
- SAMPIMON, O.C.; DeVLIEGHER, S.; BARKEMA, H.W.; SOL, J.; LAM, T.J.G.M. Effect of prepartum dry cow antibiotic treatment in dairy heifers on udder health and milk production. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.4395–4403, 2009.
- SCHANBACHER, F.L.; TALHOUK, R.S.; MURRAY, F.A.; et al. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Prod. Sci.*, v.50, p.105–123, 1997.
- SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *J. Dairy Sci.* v.84, p.1407–1412, 2001.
- SCHRICK, F.N.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biol. Reprod.*, v.49, p.617–621, 1993.
- SHAFER-WEAVER, K.A.; CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.1696–1706, 1999.
- SHAFER-WEAVER, K.A. e SORDILLO, L.M. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.* v.79, p.1347–1352, 1996.
- SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.3763–3774, 1991.
- SMITH, K.L. Mastitis control: a discussion. *J. Dairy Sci.*, v.66, p.1790–1794, 1983.
- SMITH, K. L.; CONRAD, H. R.; PORTER, R.M. Lactoferrin and IgG immunoglobulins from involuted bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, v.54, p.1427–1435, 1971.
- SMITH, K.L. e HOGAN, J.S. Environmental mastitis. *Veterinary Clinics*

- of North America. *Food Animal Practice*. v.9, p.489, 1993.
- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Environmental mastitis: Know your opponent. IN: REGIONAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Green Bay, Wisconsin, 2008.
- SMITH K.L.; SCHANBACHER F.L. Lactoferrin as a factor of resistance to infection in the mammary gland. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.170, p.1224–1227, 1976.
- SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.1531–1553, 1985a.
- SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.402–417, 1985b.
- SORDILLO, L.M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, v.98, p.89-99, 2005.
- SORDILLO, L.M.; REDMOND, M.J.; CAMPOS, M.; et al. Cytokine activity in the bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Can. J. Vet. Res.*, v.55, p.298-301, 1991.
- SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.1851–1865, 1997.
- STEENEVELD, W.; HOGVEEN, H.; BARKEMA, H.W.; et al. The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.1391–1402, 2008.
- TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Growth of Gram-negative bacteria in dry cow secretion, *J. Dairy Sci.*, v.73, p.363–372, 1990.
- TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; SCHOENBERGER, P.S. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows, *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.184–188, 1991.
- TOMITA, G.M; NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; WREN, B. Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* v. 81, p. 2159-2164, 1998
- TOMITA, G.M; RAY, C.H.; NICKERSON, S.C. A comparison of two commercially available *Escherichia coli* J5 vaccines against *E.coli* intramammary challenge. *J. Dairy Sci.* vol.83, p.2276-2281, 2000.
- TOMITA, G.M.; TODHUNTER, D.A.; HOGAN, J.S. et al. Immunization dairy cows with an *Escherichia coli* lipopolysaccharide vaccine. *J. Dairy Sci.* v.78, p.2178-2185, 1995.
- TYLER, J.W.; CULLOR, J.S.; OSBUM, B.I.; et al. Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111:B4 (J5) and clinical coliform mastitis. *Am. J. Vet. Res.* v.49, p.1950, 1988.
- TYLER, J.W.; CULLOR, J.S.; SPIER, S.J.; SMITH, B.P. Immunity targeting common core antigens of Gram-negative bacteria. *J. Vet. Int. Med.*, v.4, p.17-25, 1990.
- TYLER, J.; SPEARS, H.; CULLOR, J.; et al. Antigenic homology among gram-negative organisms isolated from cattle with clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* v.74, p.1235-1242, 1991.
- TYLER, J.; SPEARS, H.; NELSON, R. Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain,

Escherichia coli O111:B4 (J5). *J. Dairy Sci.* v.75, p.1821-1825, 1992.

WERVEN, T.V.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; DAEMEN, A.J.J.M.; et al. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.67-74, 1997.

WELTY, F.K.; SMITH, K.L.; SCHANBACHER, F.L. Lactoferrin Concentration During Involution of the Bovine Mammary Gland. *J.Dairy Sci.*, v.59, n.02, p.224-231, 1976.

WENZ, J.R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B.; et al. *Escherichia coli* Isolates Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. *J.Dairy Sci.*, v.89, p.3408-3412, 2006.

WALLER, K.P. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.480, p.231-245, 2000.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J. et al. Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.4282-4288, 2007a.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; GONZALEZ, R.N.; et al. Milk Production Change Following Clinical Mastitis and Reproductive Performance Compared Among J5 Vaccinated And Control Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* v.91, p.3869-3879, 2008.

WILSON, D.J.; MALLARD, B.A.; BURTON, J.L.; et al. Association of

Escherichia coli J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.16, n.02, p.209-217, 2009.

WILSON, D.J.; MALLARD, B.A.; BURTON, J.L.; et al. Milk and Serum J5-Specific Antibody Responses, Milk Production Change, and Clinical Effects following Intramammary *Escherichia coli* Challenge for J5 Vaccine and Control Cows. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, p.

