

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**UTILIZAÇÃO DA VACINA *Escherichia coli* J5
NA IMUNIZAÇÃO DE VACAS E NOVILHAS
LEITEIRAS CONTRA MASTITES CAUSADAS
POR *Escherichia coli*.**

MARIANNA BARBOSA GENTILINI

BELO HORIZONTE
2010

Marianna Barbosa Gentilini

**UTILIZAÇÃO DA VACINA *Escherichia coli* J5 NA IMUNIZAÇÃO
DE VACAS E NOVILHAS LEITEIRAS CONTRA MASTITES
CAUSADAS POR *Escherichia coli***

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

2010

G338u Gentilini, Marianna Barbosa, 1982-

Utilização da vacina Escherichia coli J5 na imunização de vacas e novilhas leiteiras contra mastites causadas por Escherichia coli / Marianna Barbosa Gentilini. – 2010.
52 p.: il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Vaca – Doenças – Teses. 3. Mastite – Teses.
4. Vacina veterinária – Teses. 5. Escherichia coli – Teses. I. Carvalho, Antônio Último de.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69

Dissertação defendida e aprovada em 05/03/2010

Pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Dr. Antônio Último de Carvalho
Orientador

Prof. Dr. Lívio Ribeiro Molina

Dr. Euler Rabelo

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e minha mãe grandes mestre e fontes de inspiração da minha vida.

A minha família e amigos sem os quais seria impossível viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a força necessária para chegar ao fim.

Aos meus pais, João e Arilda, minha irmã Guta, Dinda, Teodora, Dindo, Vovô e Vovó, tios e primos pelo grande incentivo, motivação e apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas Paula e Nique, sem vocês nada disso seria possível, obrigada por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, dos confusos aos maravilhosos.

Aos grandes amigos que compartilharam minhas alegrias e aflições e ao Johnny e Gregory pelos momentos de descontração e por me ensinarem que há apenas três opções: ser bom, tornar-se bom ou desistir.

Ao Marcel pela extrema paciência e compreensão.

À Escola de Veterinária da UFMG e CNPQ.

À Biogénesis-Bagó nas pessoas do Dr. Reuel, Luiz Paulo e Thiago que possibilitaram esta incrível parceria e a execução deste trabalho.

Ao Breno Silva, Ernane, Geraldinho e Raquel da Fazenda Queima Ferro pelo extremo auxílio e dedicação durante o experimento.

Ao Prof. Miguel Hourí Neto e ao funcionário Danilo Bastos pelo imenso auxílio com a estatística.

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

Ao Professor Lívio Molina, nada seria capaz de traduzir o quão importante ele foi para formação da pessoa que sou hoje. Muito obrigada pelos ensinamentos, orientação e, principalmente, pela lição de vida.

Em especial, a três pessoas fundamentais que com carinho, dedicação e motivação possibilitaram a conclusão de mais esta etapa da minha vida:

Letícia Mendonça absolutamente por tudo, seu tempo, sua vida, sua experiência e carinho.

Paula Cristina esta dissertação também é sua, obrigada por todo o apoio psicológico e por estar ao meu lado sempre.

A Kel, amigo que é amigo entra em roubada junto! Obrigada por tudo.

A todos que possibilitaram a execução deste trabalho e estiveram comigo em todos os momentos, muito obrigada.

"A persistência é o caminho do êxito."
Charles Darwin

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	ABSTRACT	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	MASTITES CAUSADAS POR COLIFORMES.....	13
2.2	A BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i>	14
2.3	ASPECTOS RELEVANTES ASSOCIADOS À MASTITE POR COLIFORMES.....	16
2.4	FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À MASTITE POR COLIFORMES.....	18
2.5	UTILIZAÇÃO DA TERAPIA DE VACAS SECAS.....	20
2.6	VACINAÇÃO COM <i>E.coli</i> J5.....	21
2.7	EFEITO DA VACINAÇÃO COM <i>E.coli</i> J5 NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E PRODUÇÃO DE LEITE.....	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O REBANHO.....	27
3.2	ANIMAIS.....	28
3.3	TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	28
3.4	IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	29
3.5	COLETA DE AMOSTRAS.....	29
3.6	DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	30
3.6.1	Identificação dos microrganismos.....	30
3.6.2	Provas de identificação dos cocos Gram positivo e catalase positivo.....	30
3.6.3	Provas de identificação dos cocos Gram positivo e catalase negativo.....	30
3.6.4	Provas de identificação de bactérias Gram negativo.....	31
3.7	PRODUÇÃO DE LEITE.....	31
3.8	MONITORAMENTO DA OCORRÊNCIA DE MASTITE.....	31
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	PREVALÊNCIA DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS NA SECAGEM E PÓS-PARTO.....	33
4.2	OCORRÊNCIA DE CASOS CLÍNICOS DE MASTITE.....	37
4.3	INTENSIDADE DOS CASOS CLÍNICOS DE MASTITE.....	40
4.4	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E PRODUÇÃO DE LEITE.....	43
5.	CONCLUSÕES	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

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-negativo isolados de mastite bovina.....	31
Tabela 3 -	Prevalência de infecções intramamárias em novilhas vacinadas	

	e não vacinadas após o parto.....	33
Tabela 4 -	Prevalência de infecções intramamárias na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas.....	34
Tabela 5 -	Infecções intramamárias por <i>E.coli</i> que se tornaram clínicas no pós-parto, em vacas vacinadas e não vacinadas.....	37
Tabela 6 -	Infecções intramamárias por <i>E.coli</i> no pós-parto que se tornaram clínicas em novilhas vacinadas e não vacinadas.....	38
Tabela 7 -	Total de vacas que apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação.....	39
Tabela 8 -	Total de novilhas que apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação.....	39
Tabela 9 -	Intensidade dos casos clínicos de mastite causados por <i>E.coli</i> em vacas e novilhas durante todo o período experimental.....	41
Tabela 10 -	Média da contagem de células somáticas (log10 células/mL) do leite e produção de leite (Kg de leite/vaca/dia) de vacas e novilhas vacinadas e não vacinadas nos primeiros 100 dias de lactação.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CCS	Contagem de células somáticas
LPS	Lipopolissacarídeo
Ig	Imunoglobulina
PMN	Polimorfonucleares
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
T_H1	Linfócito T helper 1 (T auxiliar)
T_H2	Linfócito T helper 2 (T auxiliar)
IFN-γ	Interferon – gama
HPB	Holandês preto e branco
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
NMC	National Mastitis Council
BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Peterson
TSI	Triple Sugar Iron

VM	Vermelho de Metila
VP	Voges- Proskauer
IL	Interleucinas
mL	Militros
Kg	Quilos

RESUMO

Avaliou-se a utilização da vacina *E.coli* J5, na imunização de vacas e novilhas leiteiras, para prevenção e controle da mastite causada por *E.coli*. A prevalência das infecções intramamárias por este agente no pós-parto, ocorrência e intensidade dos casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação, bem como sua influência na contagem de células somáticas e produção de leite foram analisadas. O grupo experimental foi composto de 318 animais, divididos em cinco grupos, formados por vacas e novilhas vacinadas e não vacinadas. As imunizações ocorreram no dia da secagem, 30 dias após a secagem e na primeira semana pós-parto. No dia da secagem e sete dias após o parto foram coletadas amostras para diagnóstico microbiológico dos patógenos causadores de mastite. A ocorrência de casos clínicos foi verificada pelo teste da caneca durante as ordenhas e os dados relacionados à intensidade destes foram anotados. Amostras foram coletadas mensalmente, a partir do décimo dia de lactação, para avaliação da contagem de células somáticas. A produção de leite foi registrada mensalmente nos primeiros 100 dias de lactação. Verificou-se redução na prevalência de *E.coli* no pós-parto em vacas vacinadas, esta redução não foi observada em novilhas. Houve redução na ocorrência de casos clínicos por *E.coli* nos primeiros 100 dias de lactação em vacas e novilhas vacinadas. Observou-se diminuição intensidade destes casos clínicos em vacas vacinadas. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na CCS de vacas e novilhas, mas vacas e novilhas vacinadas apresentaram maior produção de leite, comparadas às vacas não vacinadas. A vacinação de vacas e novilhas com *E.coli* J5 foi eficaz em reduzir a prevalência de infecções intramamárias ao parto, ocorrência e intensidade dos casos clínicos e aumento na produção de leite nos primeiros 100 dias de lactação.

Palavras-chave: mastite, coliforme, vacina, *E.coli* J5, casos clínicos, vacas, novilhas.

ABSTRACT

Immunization of cows and dairy heifers with *E.coli* J5 vaccine in order to prevent and control mastitis caused by *E.coli* was evaluated. Prevalence of postpartum intramammary infections by this agent; clinical mastitis occurrence and severity during the first 100 days of lactation, and its influence on somatic cell counts and milk yield were analyzed. Experimental group consisted of 318 animals. Cows and heifers were randomly assigned into five groups of vaccinated and unvaccinated animals. Immunizations occurred at dry off, 30 days after dry off and in the first week after calving. Milk samples were collected on dry off and after calving for identification of mastitis causing pathogens. Clinical mastitis occurrence was diagnosed by Tamis test and the data related to its severity was recorded. Milk yield and SCC were determined monthly during the first 100 days of lactation. There was a reduction in prevalence of postpartum intramammary infections caused by *E.coli* in vaccinated cows, the same was not observed in heifers. Vaccinated cows and heifers had less clinical cases than unvaccinated group. There was a reduction in severity of clinical signs in vaccinated cows. Milk SCC did not differ between the experimental groups. Milk production was higher in vaccinated cows and heifers compared to unvaccinated groups. Immunization with the *E.coli* J5 vaccine was effective in reducing prevalence of postpartum intramammary infections, occurrence and severity of clinical mastitis and increase in milk yield in the first 100 days of lactation.

Key words: coliform, mastitis, vaccine, *E.coli* J5, cows, heifers.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias conhecidas como coliformes compreendem o grupo mais importante de microrganismos responsáveis pelos casos de mastite clínica ambiental. Com o aumento na preocupação em melhorar a qualidade do leite, a mastite ambiental, principalmente aquela causada por coliformes, poderia ultrapassar a mastite contagiosa em importância econômica. Esta tendência é atribuída à diminuição nas perdas de produção em rebanhos com baixa CCS e pelo aumento na quantidade de vacas nestes rebanhos com maior susceptibilidade à mastite por coliformes, além de aumento na densidade animal, resultando em maior exposição dos animais às bactérias.

O maior impacto econômico das mastites por coliformes é o custo decorrente dos casos clínicos de mastite aguda, devido ao grande descarte de leite, à ineficiência do tratamento com antibióticos e à alta taxa de mortalidade relacionada ao choque endotóxico oriundo da infecção por estes agentes.

Assim como as implicações econômicas da mastite por coliformes, sua importância na saúde pública não deve ser negligenciada. O uso extensivo de antibióticos para o tratamento e controle da mastite tem implicações na saúde humana, tal como o aumento no risco do surgimento de cepas bacterianas resistentes que podem adentrar à cadeia alimentar. Aliado a este fato, é importante considerar a tendência mundial de combate às doenças infecciosas em rebanhos, que baseia-se no conceito de medicina da produção. Esta é caracterizada por possuir uma visão holística, integrada, pró-ativa e economicamente sustentável, visando a promoção da saúde dos animais e não apenas o tratamento de doenças. O aumento da produtividade e saúde dos animais de produção é realizado por meio

da prevenção de doenças, considerando, o bem-estar animal, a segurança alimentar, a saúde pública e sustentabilidade ambiental.

A ocorrência de novas infecções intramamárias no período seco é um dos principais fatores que afetam a manifestação de mastite clínica por coliformes no início da lactação, sendo estes casos mais severos e associados ao período de imunossupressão. Observa-se que, em algumas circunstâncias, as concentrações de anticorpos no soro e no leite podem aumentar com o uso de vacinas, contra coliformes, constituídas de microrganismos mutantes, tais como *E.coli* J5. A vacinação, portanto, pode ser eficaz no aumento da resistência das vacas às infecções por coliformes no período pós-parto, reduzindo, significativamente, as perdas causadas por esta doença.

Estudos controlados, na Europa e Estados Unidos, demonstraram a eficiência da imunização de animais com *E.coli* J5, não somente no que se refere à ocorrência de novas infecções intramamárias e de casos clínicos de mastite, bem como a intensidade dos mesmos. No entanto, verifica-se que as condições de produção e, conseqüentemente os fatores de risco, em rebanhos brasileiros são bastante distintas, se comparadas a outros países. Os sistemas de produção brasileiros são, em sua maioria, extensivos e semi-intensivos, estando as vacas expostas a ambientes altamente contaminados, especialmente nos momentos pré e pós-parto. Apesar de alguns rebanhos brasileiros utilizarem a vacina *E.coli* J5, há carência de estudos científicos comprovando o efeito desta nas condições supracitadas.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar 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*, em diferentes ordens de lactação. Para tanto, foi analisada a prevalência das infecções intramamárias por estes agentes no pós-parto, a ocorrência e intensidade dos casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação, bem como sua influência na contagem de células somáticas e produção de leite em vacas e novilhas leiteiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastites causadas por coliformes

As bactérias Gram-negativo são os agentes etiológicos mais isolados de casos clínicos de mastite aguda. O termo “coliforme”, apesar de não possuir significado taxonômico, é, frequentemente, utilizado para se referir às mastites causadas por bactérias Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, sendo estas: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp (Hogan e Smith, 2003). Outras bactérias Gram-negativo comumente isoladas de infecções intramamárias incluem as espécies *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus*.

As bactérias Gram-negativo causadoras de mastite são consideradas patógenos ambientais (Hogan et al., 1999). A transmissão destas bactérias entre animais, isto é, de glândulas mamárias infectadas para sadias, parece mínima se comparada à constante exposição ambiental. Os coliformes estão amplamente difundidos no ambiente das vacas leiteiras, existindo na cama, no esterco, no barro, no solo e na água, sendo estas as fontes de infecção (Burton et al., 2002). A *Escherichia coli* é um habitante normal do trato gastrointestinal dos animais. Tanto a *Klebsiella* spp, quanto a *Enterobacter* spp podem ser encontradas no solo, na água e

no trato gastrointestinal dos animais. *Serratia* sp, *Pseudomonas* e *Proteus* podem contaminar a água e frascos utilizados para limpeza dos tetos antes da ordenha (Hogan e Smith, 2003).

Apesar da adoção de certas medidas de manejo serem capazes de reduzir o número de infecções intramamárias causadas por patógenos contagiosos, vários estudos indicam que a incidência de mastite causada por bactérias Gram-negativo, ou se manteve constante ou aumentou nos últimos anos (Hillerton et al., 1995; Bradley, 2002; Makivec e Ruegg, 2003). A desinfecção de tetos após a ordenha (pós-dipping) e a terapia de vacas secas não são efetivos no controle de mastites por coliformes, devido à constante exposição de tetos aos coliformes no ambiente das vacas (Tomita et al., 2000). As bactérias Gram-negativo são responsáveis por, aproximadamente, um terço de todos os casos clínicos de mastite em bovinos e cerca de 25% dos casos resultam em descarte ou morte do animal (Bannerman et al., 2008; Ziv, 1992).

As infecções intramamárias causadas por coliformes, tipicamente, resultam da invasão da glândula mamária pela bactéria através do canal do teto, por meio do contato dos tetos com o ambiente. Após a invasão, os coliformes podem se multiplicar ou permanecer em latência por dias (Bradley e Green, 2001). Apesar da glândula mamária não ser considerada um habitat natural para estas bactérias, muitas cepas são capazes de sobreviver e se multiplicar no interior desta. A mastite por coliformes caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente, de curta duração e, frequentemente, com manifestação sistêmica e com maior frequência nos momentos pré e pós-parto imediato, coincidindo com o período de imunossupressão (Burvenich et al., 2003).

Este tipo de mastite é um problema de maior importância em rebanhos com baixa prevalência de agentes contagiosos e em vacas com CCS menor que 150.000 células/mL, sendo a *Escherichia coli* o agente mais importante e o mais frequentemente isolado de casos clínicos de mastite (Bradley e Green, 2004; Green et al., 2007). Hogan et al. (1989) estudaram a mastite clínica em rebanhos que haviam controlado os patógenos contagiosos medido pela CCS e verificaram que, nestes rebanhos, mais de 80% dos casos de mastite foram causados por patógenos ambientais. Miltenburg et al. (1996) estudando a incidência da mastite clínica em rebanhos com altas e baixas contagens de células somáticas no tanque de refrigeração, observaram um grande aumento na incidência de mastite clínica, com a redução na CCS de tanque de 250.000 células/mL para 150.000 células/mL, sendo o principal patógeno isolado a *E.coli*.

Os prejuízos relacionados aos casos clínicos de mastite por coliformes incluem desde redução na produção de leite até morte do animal em casos mais severos. Cerca de 10% dos casos severos resultam em morte da vaca (Wilson et al., 2007; Chaneton et al., 2008).

2.2 A bactéria *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, fermentadora de lactose e aeróbia facultativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. A parede celular de bactérias Gram-negativo é composta de uma camada de lipopolissacarídeos (LPS), a qual é formada por três camadas: uma camada interna hidrofóbica composta do lipídeo A (também chamada núcleo lipopolissacarídeo), uma camada média de oligossacarídeos e a camada externa de polissacarídeos hidrofílicos, onde estão localizados os antígenos O e K (Hogan e Smith, 2003). Baseada na diferença

antigênica das estruturas do antígeno-O, antígeno-K (capsular) e antígeno-H (flagelar), as cepas de *E.coli* podem ser divididas em sorotipos ou sorovares O:H:K (Lehtolainen, 2003). Mais de 700 tipos antigênicos ou cepas são conhecidos baseados nos antígenos das cadeias O, H e K (Burvenich et al., 2007).

As cepas de *E.coli* isoladas de mastites bovinas são bastante similares àquelas encontradas nas fezes. Há uma grande variedade de sorotipos, no entanto, as regiões centrais da parede celular e o lipídeo A do LPS são comuns a todos os sorotipos de *E.coli* e da família *Enterobacteriaceae* em geral (Tomita et al., 2000; Burvenich et al., 2003).

A *E.coli* produz fatores de virulência envolvidos na patogenia da mastite, os quais são necessários para colonizar, infectar e proteger o agente contra os mecanismos de defesa do animal (Burvenich et al., 2003). Estes fatores incluem toxinas, adesinas, proteínas secretadas nas células do animal, cápsula de polissacarídeo e antígeno-O, além de outros mecanismos para resistência da bactéria contra sua destruição pelas células de defesa do animal e sistema de aquisição de ferro (Harel e Martin, 1999).

O fator de virulência mais importante da *E.coli* é o LPS. A endotoxina, ou LPS, é o maior constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativo e é liberada durante o crescimento e destruição da bactéria. O LPS é a molécula chave que contribui para os sinais de inflamação locais e sistêmicos que acompanham a mastite por Gram-negativos. O LPS, também, protege o organismo invasor contra as defesas celulares e humorais do sistema imune do animal, além de exibir uma grande variedade de atividades biológicas, direta ou indiretamente, envolvidas na patogenia do choque endotóxico (Oishi et al., 1992).

Ainda, o LPS parece estar envolvido na resistência bacteriana à destruição da bactéria mediada por complemento (Wilson e González, 2003). A glândula mamária bovina é bastante sensível a baixas dosagens de LPS e a injeção deste na glândula mamária de vacas sadias pode induzir a episódios clínicos de mastite (Burvenich et al., 2007).

Uma grande parte das infecções intramamárias por *E.coli* são eficientemente combatidas pelo sistema imune da glândula mamária, resultando em eliminação do patógeno invasor sem a apresentação de sinais sistêmicos da doença. Na maioria dos casos, a bactéria não coloniza o parênquima mamário, porém verifica-se que certas cepas de *E.coli* são capazes de invadir e se aderirem ao epitélio mamário, causando infecções intramamárias crônicas e casos recorrentes de mastite clínica (Döpfer et al., 2000). Bradley e Green (2000) realizaram um estudo objetivando verificar a prevalência de infecções intramamárias adquiridas durante o período seco e o impacto destas na ocorrência de casos clínicos de mastite no início da lactação. Os autores demonstraram a habilidade de *E.coli* em persistir na glândula mamária e permanecer em latência durante o período seco, apenas causando casos clínicos de mastite no início da lactação.

A mastite clínica por *E.coli* ocorre quando a bactéria penetra na glândula mamária e induz uma resposta inflamatória aguda e intensa na glândula, visando o controle da infecção. A contagem bacteriana no interior da glândula mamária atinge picos entre 12 e 24 horas após a invasão (Bradley e Green, 2000). Durante a multiplicação da bactéria ou após sua destruição, há intensa liberação de LPS (Kremer et al., 1990; Bradley, 2002; Burvenich et al., 2006). Uma vez liberada, a endotoxina atua aumentando a quimiotaxia de neutrófilos, bem como seu recrutamento

do sangue para a glândula mamária, iniciando uma complexa cascata de eventos imunológicos que desencadeiam os sinais locais e sistêmicos da inflamação (Leininger, 2001). Após a migração, os neutrófilos iniciam a fagocitose de células bacterianas, a qual é aumentada pela opsonização, isto é, o reconhecimento imunológico da bactéria por meio de sua ligação com anticorpos, em especial, IgG e IgM (Burton et al., 2002; Burvenich et al., 2007). Os neutrófilos, então, engolfam e destroem as bactérias opsonizadas, liberando, posteriormente, seu conteúdo (Burton e Erskine, 2003).

A inflamação da glândula mamária está associada à rápida proliferação da bactéria no leite, a qual desencadeia edema agudo, ativação de fatores de complemento no leite e outros sistemas anti-inflamatórios, com aumento pronunciado da contagem de células somáticas no leite (Riollet et al., 2000). Enquanto causa dor, inchaço e leite anormal, o edema é crítico na mastite por *E.coli*, pois permite a transudação de anticorpos, complemento e congulinina do sangue para o úbere, facilitando a eliminação de patógenos opsonizados, pelos neutrófilos. O aumento dramático da CCS no leite, que acompanha a mastite por *E.coli*, reflete o recrutamento intenso de neutrófilos do sangue para o leite devido às citocinas proinflamatórias (principalmente TNF- α , IL-1 e IL-8) secretadas por macrófagos mamários patogêno-ativados, células epiteliais e células endoteliais (Riollet et al., 2000). As citocinas são responsáveis pelos sinais locais da inflamação como inchaço, vermelhidão e dor, assim como por sinais sistêmicos como febre, taquicardia, aumento da frequência respiratória, anorexia e depressão (Burton et al., 2002). Algumas vacas podem apresentar septicemia associada a disfunção múltipla

de órgãos, hipotensão, acidose láctica, falência renal, choque séptico e morte (Shpigel, 2001).

A resposta imune pode não funcionar de maneira efetiva no início da lactação, isto é, no pós-parto imediato. E esta pode ser uma das razões responsável pela maior frequência casos severos de mastite clínica neste período (Dosogne et al., 2002; Sordillo et al., 2002; Burvenich et al., 2003; Hogan e Smith, 2003). Vacas com alta produção de leite apresentam severa imunossupressão no período pré-parto. O balanço energético negativo associado a alta produção de leite e o desenvolvimento de doenças metabólicas como, cetose e deficiências nutricionais, demonstraram-se como fatores responsáveis pela imunossupressão (Goff e Horst, 1997; Mallard et al., 1998; Sordillo, 2005).

2.3 Aspectos relevantes associados à mastite por coliformes.

A importância do período seco como fator de risco na dinâmica de infecções intramamárias em vacas leiteiras tem sido objeto de vários estudos (Smith et al., 1985; Todhunter et al., 1991; Bradley e Green, 2000; Green et al., 2002; Bradley e Green 2004). Segundo Bradley e Green (2004), as infecções intramamárias que estão presentes durante o período seco podem ser divididas entre infecções pré-existentes, ou seja, aquelas que foram adquiridas durante a lactação e continuaram durante o período seco; e novas infecções, isto é, aquelas que foram adquiridas entre a secagem e o parto.

A probabilidade de ocorrência de uma nova infecção intramamária durante o período seco é influenciada pela taxa de exposição à patógenos potenciais (por exemplo, do ambiente), fatores que afetam a susceptibilidade individual do animal à infecção (Dingwell et al., 2004) e a eficiência da proteção oferecida por

intervenções medicamentosas como a antibioticoterapia para vacas secas (Bradley e Green, 2001; Berry e Hillerton 2002; Huxley et al., 2002; Robert et al., 2006). Algumas diferenças têm sido descritas nos padrões de infecções intramamárias durante o período seco entre fazendas ao longo do tempo, mas a razão para estas diferenças ainda não foi completamente elucidada (Green et al., 2007).

Mais da metade dos casos clínicos causados por coliformes no terço inicial da lactação se originam do período seco (Bradley e Green, 2004). Segundo Hogan e Smith (2003), as infecções intramamárias por coliformes adquiridas no período seco representam, aproximadamente, 34% de todos os casos clínicos por coliformes durante a lactação, sendo que 65% destes casos ocorreram nos primeiros 80 dias de lactação.

A *E.coli* pode persistir no interior da glândula mamária por até 100 dias e este fenômeno foi identificado como importante contribuinte na dinâmica da incidência de casos clínicos de mastite por este agente (Döpfer et al., 2000; Bradley e Green, 2001; Döpfer et al., 2001; Passey et al., 2007). Aproximadamente, 71% de todas as mastites clínicas por coliformes nos 100 primeiros dias de lactação são de quartos que se encontram previamente infectados, no período seco com o mesmo agente causador de mastite clínica (Bradley e Green, 2000).

A suscetibilidade da glândula mamária a novas infecções intramamárias é extremamente alta no início do período seco e no período pré-parto (Sordillo et al., 2002). Estes períodos coincidem com fenômenos fisiológicos locais e sistêmicos únicos, em que ocorrem alterações consideráveis de remodelamento no tecido

mamário além de aumento na demanda nutricional (Burvenich et al., 2007).

A fase de maior risco de novas infecções intramamárias durante o período seco é a fase inicial, especificamente, as três primeiras semanas após a secagem, que corresponde à chamada fase de involução ativa. A extração do leite, excelente meio para o crescimento bacteriano, é interrompida, bem como os mecanismos de desinfecção dos tetos (pré e pós-dipping), portanto, não há mais a retirada contínua das bactérias no canal do teto, aumentando a carga bacteriana no interior deste (Burvenich et al., 2006). Com a estase do leite, há aumento na pressão interna da glândula mamária, nos primeiros dias após a secagem, ocorrendo dilatação do teto e, conseqüentemente, maior penetração bacteriana através do esfíncter do teto (Green et al., 2002). Segundo Oldham et al. (1991), o canal do teto se dilata entre 0-7 dias após a secagem quando, então, se restringe entre 7 a 16 dias após a secagem.

Ainda, os leucócitos atingem a glândula mamária a partir do sexto dia após a secagem, sendo que os níveis protetores, cerca de 1 milhão de células/ml (Burvenich et al., 2006), não são atingidos até o oitavo dia após a secagem (Sordillo, 2005). Após a diapedese os leucócitos fagocitam glóbulos de gordura e debris celulares, ocorrendo diminuição de sua atividade fagocítica as bactérias. A relação citrato/lactoferrina é muito alta, diminuindo a ação bacteriostática da lactoferrina. Isto ocorre porque o citrato compete com a lactoferrina pela ligação com o ferro, resultando em um complexo ferro-citrato que pode ser utilizado pelas bactérias para multiplicação (Burvenich et al., 2008).

Após a completa involução da glândula mamária, atingida cerca de três a quatro semanas após a secagem, esta se apresenta bastante resistente a novas infecções que, se ocorrerem, serão rapidamente eliminadas

(Bradley e Green, 2000). Isto ocorre pelo fato de os tetos se encontrarem selados pela formação do tampão de queratina. Este não só forma uma barreira física contra a entrada de patógenos, mas possui ácidos graxos esterificados e não-esterificados, que são inibitórios ao crescimento bacteriano (Bradley e Green, 2004). No entanto, em torno de 7 a 10 dias são necessários para a formação deste tampão, (Hogan et al., 1988). Alguns estudos indicam que a velocidade da formação do tampão de queratina está associada ao alto risco de aquisição de novas infecções intramamárias durante o período seco (Bradley e Green, 2004). Um estudo, realizado por Dingwell et al. (2002), demonstrou que 50% dos tetos apresentavam-se fechados em torno de sete dias após a secagem. Contudo, após seis semanas, 23% dos tetos permaneciam abertos, isto é, sem a formação do tampão de queratina e este fato esteve associado à maior ocorrência de novas infecções intramamárias.

Também, após a involução completa, o volume de fluido na cisterna da glândula é baixo e a composição do meio não é favorável ao crescimento bacteriano. Uma alta concentração de leucócitos é atingida e sua capacidade fagocítica não se encontra inibida pela presença de gordura e caseína (Sordillo, 2002). Aliado a este fato, há diminuição na relação citrato/lactoferrina. As altas concentrações de lactoferrina na glândula mamária involuída e aumento das concentrações de imunoglobulinas promovem a inibição do crescimento bacteriano, em especial, de bactérias Gram-negativo (Kutilla et al., 2003).

A lactoferrina é uma glicoproteína queladora de ferro encontrada no leite, em algumas secreções e nos grânulos de polimorfonucleares, em especial linfócitos, e é sintetizada por células do epitélio glandular da glândula mamária (Kutilla et al., 2003; Chaneton et al., 2008). Esta proteína apresenta capacidade

bacteriostática através da ação inibitória ao crescimento bacteriano por se ligar aos íons de ferro, tornando-os indisponíveis para o crescimento bacteriano (Chaneton et al., 2008). Possui ainda atividade bactericida pela interação direta com as porções catiônicas N-terminais dos compostos bacterianos. Dentre os patógenos causadores de mastite, a *E.coli* é a mais suscetível a ação desta proteína (Burvenich et al., 2006). A lactoferrina é considerada um fator relevante dos mecanismos de defesa inatos da glândula mamária contra infecções intramamárias e se apresenta em concentrações elevadas durante o período de involução da glândula e durante as infecções (Komine et al., 2005; Hagiwara et al., 2003). As concentrações normais de lactoferrina no leite são de, aproximadamente, 0,1 mg/ml, porém, na secreção mamária durante o período seco, estas concentrações podem chegar a 20 mg/ml ou mais (Schanbacher et al., 1997).

No final do período seco, ocorre nova fase de transição na glândula mamária sob ação hormonal do final da gestação (Sordillo, 2005). Este período se caracteriza pela regeneração e diferenciação das células epiteliais secretoras, transporte seletivo e acúmulo de imunoglobulinas para formação do colostro, iniciando-se, geralmente, 15-20 dias pré-parto (Burvenich et al.; 2008). Há diminuição nos níveis de lactoferrina e aumento nos níveis de citrato devido à retomada da síntese de leite (Cheng et al., 2008). As concentrações de imunoglobulinas, particularmente a IgG₁, começam a aumentar duas a três semanas pré-parto, sendo que sua máxima concentração ocorre cerca de 5 a 10 dias antes do parto (Sordillo e Nickerson, 1988). O número de leucócitos não só diminui como também sua capacidade fagocítica pelo aumento nas concentrações de gordura e caseína. Além disso, durante a colostrogênese, fatores sistêmicos influenciam negativamente as respostas imunes do animal. O estresse devido ao

parto estimula a produção de uma variedade de hormônios que têm importante efeito na resposta imune do animal. Os corticosteróides promovem diminuição no número, distribuição e função de leucócitos no sangue, além de diminuição na migração de neutrófilos no período pós-parto (Burton e Erskine, 2003; Preslier et al., 2000).

2.4 Fatores de risco associados à mastite por *Escherichia coli*.

Vacas no periparto, e de alta produção, são especialmente suscetíveis a mastite devido a imunossupressão (Burvenich et al., 2003). As possíveis razões para isto podem ser o estresse fisiológico causado pela lactogênese, diminuição no número e função de neutrófilos circulantes capazes de realizar fagocitose, atraso na montagem da resposta inflamatória e capacidade enfraquecida de eliminação da bactéria por neutrófilos (Dettleux et al., 1995; Burvenich et al., 2000; Meglia et al., 2001, Pyörälä, 2002).

A falha na montagem de uma resposta imune satisfatória em vacas leiteiras durante as mastites por *E.coli* pode estar associada com mudanças no fenótipo de células mononucleares do sangue durante o período pré-parto (Burton e Erskine, 2003). Uma resposta imune eficaz contra patógenos invasores da glândula mamária é a resposta do tipo T_H1, por envolver a ativação destes linfócitos (T_H1-CD4+), secreção de altos níveis de IFN- γ , com consequente produção de anticorpos IgG₂ pelos linfócitos B e recrutamento maciço de neutrófilos para a glândula mamária. Contudo, verifica-se que, durante a gestação, a resposta do tipo T_H1 pode resultar em absorção fetal, uma vez que as citocinas produzidas por este tipo de resposta são prejudiciais para manutenção da prenhez, por isso o sistema imune preferencialmente monta respostas do tipo T_H2. Este tipo de resposta, dominada por linfócitos T_H2 e secreção de IL-4 e IL-10,

geralmente, desencadeiam a produção de anticorpos IgM e IgG₁, resultando em menor recrutamento de PMN para a glândula mamária, com significativa redução na eficiência da eliminação de patógenos invasores (Burton e Erskine, 2003).

Uma grande variabilidade com relação à resposta biológica individual às infecções intramamárias, entre vacas, é observada no periparto. Na realidade, todos os graus de intensidade de mastite, de subclínica à aguda, são possíveis neste período (Dosogne et al., 2002). Se a vaca experimenta uma larga demanda de neutrófilos para glândula mamária, isto é, no caso de infecção bacteriana, quando a vigilância imune está temporariamente enfraquecida, ou seja, no periparto, a doença severa pode acontecer como resultado da resposta inflamatória retardada. A demora de apenas 20 minutos dos neutrófilos em atingir a glândula mamária não é insignificante, considerando-se que a *E.coli* pode dobrar sua população neste tempo. Uma hora de atraso no recrutamento de neutrófilos para o interior da glândula mamária resulta em uma população de *E.coli* oito vezes maior para eliminar e quantidades elevadas de toxina para ser detoxificada. Este atraso no recrutamento de neutrófilos foi relatado em vários estudos (Hill et al., 1981; Heyneman et al., 1990; Vandeputte-Van Messom et al., 1993; Burvenich et al., 2003; Burvenich et al., 2007). Segundo Detilleux et al. (2006) mais de 2×10^6 células somáticas/ml são necessárias para combater uma infecção intramamária por *E.coli*.

Nestes casos, o progresso feito pelo patógeno invasor é tão rápido, ou a resposta inflamatória do animal tão lenta, que as vacas apresentam uma reação sistêmica grave devido à deficiência em controlar o patógeno e a alta absorção de LPS para a

corrente sanguínea (Burvenich et al., 2007; Wilson et al., 2007). Assim, os animais podem ser classificados, no início da lactação, como aqueles que apresentam resposta moderada ou intensa à doença (Burvenich et al., 2003). No caso de animais com resposta intensa, o crescimento de *E.coli* no interior da glândula mamária é bastante rápido, com grande liberação de LPS. Quando a resposta inflamatória é equilibrada, este crescimento é controlado e, apenas, pequenas quantidades de bactéria permanecem no interior da glândula mamária. Consequentemente, baixos níveis de LPS são liberados, levando a uma resposta inflamatória moderada com produção de citocinas específicas pelos macrófagos, promovendo a modulação de uma resposta imune satisfatória, sem a apresentação de sinais clínicos sistêmicos (Burton et al., 2002; Burton e Erskine, 2003; Burvenich et al., 2007).

Shuster et al. (1996) realizaram um estudo inoculando *E.coli* em vacas logo após o parto e em vacas no meio da lactação, no intuito de verificar o porque de vacas, após o parto, serem mais susceptíveis a mastite por *E.coli* que vacas em lactação mais avançada. Verificou-se que vacas no pós-parto realmente apresentavam casos mais severos de mastite clínica, mas este fato não esteve relacionado ao baixo recrutamento de leucócitos. Na realidade, vacas no pós-parto recrutam leucócitos mais rápido e em quantidades maiores. Os autores observaram uma contagem de células, inicialmente, menor em vacas, imediatamente, após o parto e sugeriram que esta pode ser a razão da maior suscetibilidade às mastites severas. Os autores atribuíram a diferença de intensidade dos sinais clínicos à inabilidade de vacas no pós-parto imediato em controlar o crescimento bacteriano nas primeiras horas após a inoculação, isto é,

antes do recrutamento de leucócitos começar. Vacas no meio da lactação, as quais apresentaram maior contagem de células no leite, aparentemente, foram capazes de controlar o crescimento bacteriano inicial em grande escala. Estes achados indicam que a baixa resposta de PMN pode ser importante em ditar a intensidade da doença clínica. Assim, vacas com baixas contagens de leucócitos no sangue e no leite, também, recrutam estas células mais lentamente, desenvolvendo, portanto, casos severos da doença (Shuster et al., 1996; Burvenich et al., 2007).

Aparentemente, tanto as contagens de células iniciais, quanto a velocidade de migração dos leucócitos para a glândula mamária, são importantes na defesa da vaca contra mastite clínica. E estes dois fenômenos parecem estar correlacionados. No entanto, outros fatores não devem ser negligenciados, tais como o status nutricional, em particular a suplementação com vitamina E e selênio (Smith e Hogan., 2003), assim como o balanço energético negativo, os quais têm demonstrado grande influência na velocidade de recrutamento e migração de neutrófilos (Suriyasathaporn et al., 1999).

A probabilidade de infecção pode ser influenciada ainda, pela interação entre fatores como: status da infecção da vaca na secagem, tendência individual do animal a se curar de uma nova infecção, estratégias de tratamento e presença de infecção ao parto (Bradley e Green, 2000). Green et al. (2007) investigaram as características relacionadas ao animal, instalações da fazenda e manejo do rebanho durante o período seco, em 52 fazendas na Inglaterra, visando avaliar a influência conjunta destes fatores na taxa de mastite clínica após o parto. Os autores verificaram que, com relação ao animal, vacas com infecções, que persistem na lactação e apresentam falha

em se curar durante o período seco, apresentam maior risco de apresentação de mastite clínica no início da lactação. Ainda, com o aumento da ordem de parto, há aumento no risco de apresentação de mastite clínica no início da lactação. Os fatores relacionados à fazenda estiveram envolvidos com a higiene, provavelmente, resultando em maior exposição a patógenos do ambiente, e na administração e seleção adequada de medicamentos para vacas secas, manejo de instalações no início e fim do período seco e área de parto.

2.5 Utilização de terapia de vacas secas.

Pelo fato do período seco e pós-parto serem períodos de grande risco de infecções intramamárias, é necessário que se estabeleçam estratégias de controle, minimizando este risco, uma vez que os sistemas antibacterianos presentes na glândula mamária possuem eficácia bastante limitada contra a mastite (Sordillo et al., 1997).

Uma das formas mais utilizadas é a administração intramamária de formulações contendo antibióticos para vacas secas ao término da lactação, isto é, no momento da secagem. A terapia com antibióticos para vacas secas possui, basicamente, duas funções: remover infecções intramamárias pré-existentes, isto é, presentes no dia da secagem e prevenir novas infecções durante o período seco. Assume-se que esta terapia não apresenta alta eficácia contra coliformes, uma vez que a maioria dos antibióticos disponíveis não tem ação contra bactérias Gram-negativo e, portanto, não possuem efeito contra novas infecções intramamárias que se iniciam no período pré-parto. Ainda, a exposição da glândula a estes patógenos durante o período seco é constante, pelos mesmos estarem amplamente difundidos no ambiente do animal (Bradley e Green, 2001a; Erskine,2001).

Halasa et al. (2009) investigaram a eficácia de várias medidas de manejo associadas a prevenção de infecções intramamárias durante o período seco. Os autores não observaram grande eficiência da terapia de vacas secas em proteger contra novas infecções por coliformes durante o período seco e atribuíram este resultado ao fato de que as novas infecções ocorrem, geralmente, no final deste período, momento no qual o antibiótico encontra-se em baixas concentrações no interior da glândula mamária.

Entretanto, a terapia de vacas secas apresenta alta eficiência contra outros tipos de patógenos que não os coliformes. Sampimon et al. (2009), estudaram o efeito da terapia de vacas secas em 184 animais com um antibiótico contendo cloxacilina. Os autores observaram altas taxas de cura para infecções intramamárias existentes na secagem e menor número de casos clínicos de mastite por patógenos Gram-positivos no grupo que recebeu o tratamento. Os autores concluíram que a utilização da terapia de vacas secas resulta em redução na prevalência de infecções intramamárias por bactérias não coliformes ao parto, em especial, bactérias Gram-positivo. Em estudo para avaliação da eficiência da terapia antimicrobiana pra vacas secas, Borm et al (2006), observaram que, aproximadamente, 24,5% das infecções intramamárias no pré-parto foram causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus* sp. e coliformes. Os quarto mamários tratados com antibiótico apresentaram 79,9% de taxa de cura, se comparados a 31,7% do quarto controle.

Investigando a incidência de infecções intramamárias por coliformes e outros patógenos no início da lactação, Bradley e Green (2001) avaliaram o impacto de um antibiótico específico para vacas secas com

ação significativa contra Gram-negativos, a base de sulfato de framicitina e hidroiodeto de penetamato. Os autores utilizaram dez rebanhos com CCS abaixo de 250.000 células/mL, isto é, cerca de 880 animais, para comparar o antibiótico com ampla ação para Gram-negativos e outro antibiótico para vacas secas, a base de cloxacilina benzatina. Os autores verificaram que as vacas, tratadas com o produto específico para Gram-negativos, estiveram sob menor risco de apresentação de mastite clínica por *E.coli*, durante o período seco ou nos primeiros 100 dias de lactação, que as vacas tratadas com o outro antibiótico. Porém, não observaram diferenças significativas com relação a outros patógenos causadores de mastite, indicando que, ambos os medicamentos, possuem eficácia no controle de infecções intramamárias. Não houve diferenças significativas entre os medicamentos com relação à CCS medida durante o período seco. Os autores concluíram que a seleção de um antibiótico de vacas secas com ampla ação para Gram-negativos pode influenciar na incidência de mastite clínica por *E.coli* na lactação seguinte e este fato deveria ser levado em consideração quando da escolha do antibiótico.

2.6 Vacinação com *E.coli* J5

A terapia de vacas secas não se apresenta como uma solução plenamente eficiente para o controle das mastites causadas por coliformes. Portanto, outra forma de controle seria a sua associação a mecanismos de aumento da resposta imune do animal (Burvenich et al., 2007). Este aumento da resposta pode ser atingido por meio de vacinações, em especial, com a vacina *E.coli* J5 (Wilson et al., 2007a).

Para a imunização de vacas contra as mastites causadas por coliformes, duas cepas mutantes de bactérias têm sido utilizadas em preparações comerciais:

Escherichia coli O111:B4 (denominada J5) e *Salmonella typhimurium* Re-17 (Wilson e González, 2003). A maioria das vacinas comerciais é composta de *E.coli* J5. A cepa J5 possui um antígeno do núcleo relativamente exposto, sendo este um lipopolissacarídeo comum às demais bactérias Gram-negativo e capaz de estimular a resposta imune do animal contra estes patógenos (Chaiyotwittayakun et al., 2004). Geralmente, as vacinações coincidem com o período de maior risco de aquisição de infecções intramamárias por coliformes, ou seja, no início e no fim do período seco e após o parto, sendo as imunizações realizadas na secagem, 30 dias antes do parto e na primeira semana após o parto (Tomita et al., 2000; Burton et al., 2002).

Visando à imunização de vacas contra mastite causada por *E.coli*, os primeiros estudos realizados foram desenvolvidos utilizando antígenos da porção “O” de oligossacarídeos heterogêneos de *E.coli*. Em um estudo de Wilson (1972), a bacterina foi inoculada na glândula mamária de animais não-lactantes e observou-se que esta estimulava a resposta local de anticorpos na lactação subsequente. Em outro estudo (Rainard, 1983a), a primeira dose da bacterina foi administrada por via subcutânea no dia da secagem e a segunda dose por via intramamária cinco semanas depois. Verificou-se que a imunização não modificava de maneira notável a transferência de imunoglobulinas sanguíneas para o leite. No entanto, os testes *in vitro*, sugeriram que a imunização com a bacterina de *E.coli* aumentava o recrutamento de fagócitos, estabelecendo uma atividade opsonizadora pré-inflamatória (Rainard, 1983b).

Entretanto, vários fatores, como a variedade de gênero, espécie e sorotipos das bactérias coliformes, bem como dos antígenos de

superfície identificados em fazendas e a necessidade de se criar vacinas específicas para esta grande variedade, tornavam impraticável a profilaxia das mastites por coliformes utilizando estas bacterinas para as imunizações (Smith, 1983).

Enquanto o canal do teto é a primeira linha de defesa contra infecções intramamárias em vacas, os neutrófilos do leite são a principal defesa imunológica quando os patógenos causadores de mastite já invadiram o canal do teto (Sordillo et al., 2005). Os neutrófilos exercem melhor sua função em fagocitar bactérias quando estas encontram-se opsonizadas pelos anticorpos. Quando as infecções intramamárias não são rapidamente controladas pelos neutrófilos, permitindo que o LPS e lipoproteínas escapem para a corrente sanguínea, os anticorpos presentes no soro sanguíneo capazes de bloquear e neutralizar estas potentes toxinas precisam estar disponíveis. Assim, o maior objetivo na prevenção de mastites por coliformes por meio da vacinação é atingir altos níveis de anticorpos efetivos anticoliformes e antitoxinas, tanto no leite, quanto no sangue e ao redor do canal do teto (Nickerson, 1985; Burton et al., 2002; Burvenich et al., 2008).

Algumas classes (isotipos) de anticorpos funcionam melhor que outros em facilitar a eliminação das bactérias do úbere pelos neutrófilos e neutralização do LPS e lipoproteínas que escapam do leite para o sangue. Estes anticorpos são particularmente importantes no período pré-parto, uma vez que, neste período, os neutrófilos destas vacas são deficientes em termos de função (Detilleux et al., 1995). Assim, os neutrófilos de animais, no período pré-parto, precisam de suporte extra de anticorpos, não apenas do isotipo correto, mas também com alta afinidade e especificidade cruzada para uma vasta

variedade de coliformes causadores de mastite. Assim, nas vacinas contra coliformes a afinidade dos anticorpos aos antígenos, deve ser ao menos, tão importante quanto a habilidade em induzir uma alta concentração de anticorpos no soro e no leite. Quando se trata de vacinas, é importante lembrar que a glândula mamária bovina divide linfócitos com o sistema imune periférico (Kherli e Harp, 2001). Isto significa que vacinas desenvolvidas para vacas leiteiras devem possuir uma capacidade de estimular os linfócitos B e T, os quais devem atingir os linfonodos rapidamente para divisão e diferenciação em células secretoras de anticorpos e, então, migrar para glândula mamária (Sordillo, 2002). Assim, a grande maioria dos anticorpos protetores deve ser oriunda do sangue, ao menos nas fases iniciais da resposta. Estes anticorpos atingem o leite por meio de transporte imuno-mediado através das células epiteliais mamárias (Verbeet et al., 1995), ou por transudação passiva durante o edema, que se segue após a infecção intramamária.

Em vacas, existem quatro imunoglobulinas importantes: IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA. A IgM sérica é bastante efetiva em neutralizar alguns tipos de toxinas e opsonizar patógenos no sangue e no leite, sendo mais eficaz na proteção contra choques tóxicos do que na diminuição de sinais de inflamação local. As IgA, apesar da concentração relativamente baixa no leite, atuam auxiliando na prevenção à colonização de patógenos e dano tecidual, via aglutinação e neutralização de toxinas (Kherli e Harp, 2001). A IgG₁ e IgG₂ são encontradas em altas concentrações no soro sanguíneo bovino, sendo a IgG₁ o anticorpo mais importante, no colostro e no leite, devido ao transporte imuno-mediado que age através das células epiteliais mamárias. Ambas, efetivamente bloqueiam a interação

de patógenos com as células do hospedeiro e neutralizam as toxinas do sangue e tecidos. No entanto, são as IgG₂ que possuem a atividade opsonizadora principal para neutrófilos bovinos, promovendo o recrutamento de neutrófilos para a glândula mamária, eliminando a infecção (Burton et al., 2002). Assim, as vacinas desenvolvidas para a prevenção de mastites causadas por coliformes devem ser capazes de promover altas concentrações destas imunoglobulinas tanto no soro quanto no leite, possibilitando a melhoria da resposta imune (Burton et al., 2002).

Neste contexto, o grande desafio no desenvolvimento de vacinas efetivas contra as mastites causadas por coliformes foi descobrir um imunógeno que seria capaz de induzir uma reação protetora cruzada, realizada por anticorpos, contra uma grande variedade de coliformes, os quais deveriam proliferar-se bem no leite e eliminar o LPS e lipoproteínas da corrente sanguínea de vacas no periparto (Burton et al., 2002). No final da década de 1980, ocorreu uma grande reviravolta nos estudos sobre vacinas contra mastites causadas por coliformes, com a introdução de bacterinas contendo cepas mutantes rugosas de bactérias Gram-negativo (Yancy, 1999; Hehrli e Harp., 2002). Nells et al., em 1984, descobriram que a maioria das bactérias Gram-negativo divide a estrutura interna do LPS (lipídeo A), a qual, além de patogênica, é extremamente antigênica e, esta, possui reação cruzada com o LPS derivado de uma grande variedade de espécies de bactérias Gram-negativo.

A *Escherichia coli* (O111:B4) J5 é uma cepa mutante rugosa que possui a cadeia "O" de polissacarídeos incompleta, expondo a metade homóloga do antígeno do núcleo do LPS. Este antígeno é uma estrutura interna do LPS, denominada lipídeo A, o qual é comum às demais bactérias Gram-negativo (Tyler et al., 1992; Dosogne et al., 2002; Burton et al., 2003; Burton e Erskine,

2003; Bradley e Green, 2004). Quando este antígeno é exposto, estimula a produção de imunoglobulinas que possuem reação cruzada contra os antígenos de núcleo de outras bactérias, resultando em imunidade associada a proteção contra uma grande variedade de gêneros e cepas de bactérias (Smith et al., 1999; Tyler et al., 1992; Dosogne et al., 2002; Wilson e González, 2003; Wilson et al., 2007a, 2007b e 2008). A utilização de *E.coli* J5 aumenta os títulos séricos e do leite de anticorpos específicos contra o LPS de *E.coli* J5, intensificando sua opsonização (Baumgartner et al., 1991; Morris et al., 1989; Dosogne et al., 2002; Burvenich et al., 2007). A vacinação com *E.coli* J5 tem demonstrado que a imunização, efetivamente, reduz a incidência e intensidade dos casos clínicos de mastite por coliformes (Cullor, 1991; González et al., 1989; González et al., 1996; Hogan et al., 1992a). Evidências convincentes existem para o uso de *E.coli* J5 como bacterina protetora contra infecções intramamárias causadas por coliformes por meio da redução dos sinais clínicos da infecção (González et al., 1989). No entanto, os mecanismos, nos quais a imunização com *E.coli* J5 realmente atuam, ainda não foram completamente esclarecidos (Dosogne et al., 2002).

Há evidências experimentais que, durante a fase de crescimento de *E.coli*, o antígeno do núcleo é exposto, momento, no qual, os anticorpos, especificamente, IgM, IgG₁ e IgG₂, se aderem à parede celular bacteriana (Dosogne et al., 2002). Um mecanismo adicional de ação envolve a neutralização de endotoxinas por anticorpos, após processamento dos produtos da parede celular bacteriana pelos fagócitos do úbere, atribuindo às endotoxinas menor toxicidade e aumentando a taxa de eliminação hepática. A eficácia de *E.coli* J5 para mastites por coliformes é ainda atribuída a correlação entre o aumento nas concentrações de IgG₁ e IgG₂ ao antígeno de núcleo de bactérias Gram-negativo e à

diminuição em 5,3 vezes do risco de ocorrência de casos clínicos em vacas (Smith et al., 1999).

O valor potencial da imunização de vacas leiteiras, utilizando bacterinas com antígeno de núcleo exposto, como *E.coli* J5, ficou evidente após a observação por Tyler et al. (1988) de que vacas, que possuíam naturalmente títulos de IgG₁ contra *E.coli* J5 menores que 1:240, apresentavam risco cinco vezes maior de ocorrência de caso clínico de mastite por coliformes, se comparadas às vacas com títulos maiores que 1:240. A partir destes achados estudos para avaliação do efeito da vacinação com *E.coli* J5 no aumento dos títulos de anticorpos, no soro sanguíneo e nas secreções mamárias, foram realizados por Hogan et al. (1992c) e Tomita et al. (1998). Os autores avaliaram amostras de soro e leite coletadas antes das imunizações, no dia da secagem, ao parto e 21 dias após o parto. A taxa de opsonização de bactérias, com 5% de soro sanguíneo de vacas vacinadas, resultou em maior índice de fagocitose, quando comparadas às vacas não vacinadas, durante o período seco e aos 21 dias após o parto. Esta intensificação na opsonização coincidiu com maiores títulos de IgM, IgG₁ e IgG₂ contra *E.coli* J5 em animais vacinados. Concluiu-se que vacas vacinadas possuem maiores títulos de anticorpos que reconhecem o núcleo LPS de *E.coli* J5 nas secreções mamárias e, por isso, estas apresentam menor risco de ocorrência de infecções intramamárias durante o período seco e ao parto.

Estudos verificando a associação entre a imunização com *E.coli* J5 e a ocorrência dos casos clínicos de mastite têm sido realizados por vários pesquisadores, apresentando redução na ocorrência de casos clínicos em vacas vacinadas, comparadas às não vacinadas, em cerca de 70% (Cullor, 1991), 80% (González et al., 1989), 72% (González et al., 1996), e 75% (Hogan et al., 1992a). Em estudo conduzido

por González et al. (1989) em duas fazendas comerciais na Califórnia – EUA, as vacas foram vacinadas com três doses da vacina *E.coli* J5, por via subcutânea, sendo as duas primeiras administradas durante período seco e a terceira dose no pós-parto e, no total, 486 vacas foram utilizadas no estudo. Diagnosticou-se um total de 35 casos clínicos de mastite causados por bactérias Gram-negativo, seis no grupo vacinado e 29 no grupo controle. A incidência de mastite clínica foi de 2,4% (6/246) no grupo vacinado e 12,1% (29/240) no grupo controle. Em pesquisa semelhante realizada por Cullor et al. (1991) apenas 2% dos animais apresentaram casos clínicos recorrentes de mastite por coliforme nos primeiros 100 dias de lactação. Em contraste, o grupo controle apresentou 25% de casos recorrentes de mastite clínica por coliformes. Os resultados destes estudos demonstraram a eficiência da vacina *E.coli* J5 em proteger contra a ocorrência de casos clínicos de mastite, oriundos de infecções naturais por bactérias Gram-negativo, em vacas leiteiras durante os três primeiros meses de lactação.

Estima-se que a duração e intensidade dos casos clínicos estão, positivamente, correlacionadas com a contagem bacteriana no leite, a qual também é responsável por sintomas sistêmicos como, o aumento da temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e diminuição do apetite mais acentuado em animais não vacinados (Clark e Roeckel, 1994; Hogan et al., 1995; Wenz et al., 2006). Hogan et al., (1992a e 1999) verificaram que vacas e novilhas vacinadas apresentaram maiores títulos de IgG séricos e no leite. Este aumento esteve negativamente correlacionado com o pico de contagem bacteriana no leite de animais vacinados, após a inoculação intramamária com *E.coli* 12, 15 e 48 horas após o desafio. Os

resultados destes estudos demonstraram que a vacinação se revelou eficaz em reduzir o pico de contagem bacteriana em quartos infectados e, conseqüentemente, a duração das infecções intramamárias e dos sinais clínicos de mastite em 25% e 50%, respectivamente, quando comparados grupos vacinados e não vacinados (Hogan et al.1995). Esta redução na contagem bacteriana, que se deve ao aumento nas concentrações séricas e do leite, de IgG e IgM, as quais agem diretamente nos antígenos da superfície de bactérias Gram-negativo, promovendo neutralização do LPS e aumento na fagocitose pelos neutrófilos (Hogan et al.,1992; Hogan et al.1997). Além disso, Clark e Roeckel (1994) após realizarem a infusão de *E.coli* B44 e B144 entre os dias 27 e 122 após a vacinação, repetindo-as 8 a 38 dias após o parto observaram que o grupo controle apresentou colonização bacteriana da glândula mamária significativamente superior ao grupo vacinado, além de menor eficiência na eliminação de bactérias da glândula. Nas culturas realizadas após o desafio, 50% do grupo vacinado apresentou eliminação completa da bactéria em glândulas infectadas, comparado a nenhum animal do grupo controle, concluindo-se que há efeito positivo direto da vacinação com *E.coli* J5 em diminuir a intensidade dos sinais clínicos de mastite por *E.coli* induzidos.

No entanto, de acordo com Tomita et al. (2000), a redução na intensidade dos casos clínicos é atribuída não só a eliminação bacteriana, mas também à neutralização do LPS, devido ao elevado título de anticorpos contra os antígenos internos do LPS de *E.coli* J5. Neste estudo, os autores observaram um aumento significativo nos títulos séricos de IgG₁ e IgG₂ relacionados ao aumento da opsonização e neutralização de toxinas em vacas imunizadas, as quais apresentaram uma eliminação bacteriana significativamente mais alta, 144 horas após

o desafio, do que vacas controle, aos 30 e 45 dias após o parto.

Wilson et al. (2007b) realizaram um estudo no intuito de verificar a associação entre a imunização com *E.coli* J5 e o desenvolvimento e intensidade de sinais clínicos, IgG₁, IgG₂ e IgM no leite antes e depois do desafio intramamário com *E.coli*. A vacinação foi administrada por via subcutânea, próximo ao linfonodo supramamário, na secagem e 30 dias antes do parto. Enquanto as vacas controle apresentaram uma resposta de anticorpos contra *E.coli* com predominância de IgM, as vacas vacinadas produziram uma resposta com predominância de IgG₁ e IgG₂, que incluiu uma alta proporção de IgG₂ (resposta do tipo 1). A vacinação com *E.coli* J5 parece induzir a maior produção de IgG₂, em especial no início da infecção intramamária por *E.coli*, a qual é benéfica na fagocitose por PMN e eliminação da bactéria do interior da glândula mamária. Os autores concluíram que a vacinação com *E.coli* J5 esteve associada à maior eliminação de bactérias da glândula mamária e menor redução na produção de leite após o desafio.

2.7 Efeito da vacinação com *E.coli* J5 na contagem de células somáticas e produção de leite.

Poucos estudos demonstraram o efeito da vacinação com *E.coli* J5 na contagem de células somáticas e produção de leite. Hogan et al. (1999) não verificaram associação entre a imunização com *E.coli* J5 em novilhas e a magnitude da resposta de CCS nestas, após o desafio intramamário com *E.coli*. A CCS não diferiu entre os animais vacinados e não vacinados. Em estudo semelhante com vacas (Hogan et al.,

2005), os autores observaram que a vacinação esteve associada a menor CCS ($p < 0,05$), cerca de 15 horas após o desafio.

Sabe-se que aproximadamente 70% das vacas infectadas por *E.coli* apresentam casos clínicos de mastite, geralmente, com manifestação sistêmica. Antes da manifestação do caso clínico a CCS é baixa, isto é, próxima aos níveis de CCS de vacas sadias. Após o caso clínico a CCS diminui rapidamente a um nível ligeiramente maior ao da pré-infecção (Haas et al., 2002). Hass et al. (2004) demonstraram a associação entre a CCS após o caso clínico de mastite e sua influência na CCS durante a lactação. Os autores observaram que a mastite clínica por *E.coli* está associada ao padrão denominado “rápida recuperação”, isto é, rápida elevação da CCS com rápido declínio da mesma. O caso clínico caracterizou-se por picos rápidos na CCS, sendo tipicamente agudo, ou seja, houve grande elevação na contagem cerca de dois dias após a infecção, porém esta retornou aos valores iniciais em, aproximadamente, três a quatro semanas depois do caso clínico.

O mesmo padrão pôde ser notado com relação à produção de leite. Gröhn et al. (2004) estimaram o efeito da primeira ocorrência de casos clínicos de mastite, causados por patógenos específicos, na produção de leite durante a lactação. Verificou-se que novilhas que apresentaram mastite clínica por *E.coli* produziram 6,7 Kg de leite/dia a menos nos primeiros 70 dias após o caso clínico, com redução para 5 Kg de leite/dia a menos durante a lactação, comparadas às novilhas sadias. Em vacas, a redução na produção após o caso clínico por *E.coli* foi de 13,1 Kg de leite/dia. Estas se recuperaram após o caso clínico, no entanto, produziram 7,2 Kg de leite/dia a menos do que vacas sem caso clínico pelo agente. Os autores concluíram que a *E.coli* é um patógeno importante tanto em vacas quanto em novilhas por promover

redução na produção de leite após o caso clínico, a qual não é completamente recuperada durante a lactação. Contudo, Schukken et al. (2009) avaliando o efeito de casos recorrentes de mastite clínica por patógenos Gram-negativo e Gram-positivo, observaram que quando o primeiro caso de mastite clínica na lactação é causado por bactérias Gram-negativo, há redução na produção de leite durante toda a lactação, mas a produção retorna aos níveis normais na lactação subsequente demonstrando que estes patógenos não causam danos permanentes na glândula mamária.

Neste contexto, a avaliação da eficiência da vacina *E.coli* J5 na CCS e produção de leite é bastante complexa e apenas observada durante o caso clínico de mastite. Wilson et al. (2007 b) observaram que, após o desafio, a CCS foi significativamente maior em vacas não vacinadas, comparadas às controle. A maioria dos quartos desafiados, em vacas controle, apresentou média de CCS de 5.429.000 células/mL e, em vacas vacinadas, esta média foi de 490.000 células/mL. A imunização de vacas com *E.coli* J5 esteve associada à menor contagem de células somáticas após o desafio intramamário com *E.coli*. Com relação à produção de leite, os autores verificaram que vacas não vacinadas produziram 7,7 Kg de leite/vaca/dia a menos após o desafio e que a produção permaneceu baixa durante a lactação. As vacas vacinadas não apresentaram redução na produção de leite. Os mesmos autores, estudando os efeitos da vacina *E.coli* J5 na produção de leite após casos clínicos de mastite por coliformes ocorridos naturalmente, observaram uma produção de leite significativamente maior em vacas vacinadas, quando o caso clínico ocorreu nos primeiros 50 dias de lactação. Estas produziram 7 a 16 Kg de leite/vaca/dia a mais do que as vacas controle (Wilson et al., 2008). Os autores concluíram, em

ambos os estudos, que a utilização da vacina *E.coli* J5 esteve associada à menor redução na produção de leite após o caso clínico de mastite por *E.coli*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações sobre o rebanho

O estudo foi conduzido no município de Pitangui, Estado de Minas Gerais, no período de março a julho de 2007. O rebanho comercial era composto de 450 vacas mestiças (Holandês preto e branco [HPB] x Gir leiteiro) em lactação, com produção média de 25 kg de leite/dia. Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia em um intervalo de 12 horas, em equipamento mecânico tipo espinha de peixe com 24 conjuntos (2x12=24) e mecanismo de extração automática de teteiras. A rotina de ordenha observava a 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 1%, 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 realizava um programa intensivo de controle de mastite por meio dos seguintes procedimentos: rotina de ordenha

higiênica, utilização de terapia de vacas secas, manutenção da limpeza dos ambientes 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 células/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 cel/ml e não responsivas a pelo menos três tratamentos para mastite clínica, eram descartadas.

Havia ainda um controle intensivo de patógenos contagiosos na fazenda, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, sendo a prevalência dos mesmos baixa. Os animais infectados com estes patógenos, identificados por meio de culturas microbiológicas realizadas após o parto, eram descartados do rebanho. 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.

A dieta das vacas em lactação constituía-se de silagem de milho como volumoso e como concentrado, uma combinação de milho, farelo de soja, polpa cítrica, caroço de algodão e pré mix comercial mineral e vitamínico. O sal comum era fornecido à vontade nos cochos, bem como água limpa, disponível em bebedouros distribuídos pelos piquetes.

3.2 Animais

O grupo experimental foi composto por 318 animais, 187 vacas e 131 novilhas. As vacas foram divididas em grupos 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, formando assim, grupos homogêneos com relação a estas variáveis. As novilhas foram divididas ao acaso obedecendo a data provável de parto.

Os animais foram separados em cinco grupos experimentais:

- **J5V** (n= 96): grupo de vacas vacinadas, receberam 3 doses de vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5);
- **J5Vcont** (n= 91): grupo de vacas controle, não receberam nenhuma dose da vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5);
- **J5N** (n= 39): grupo de novilhas vacinadas, receberam 3 doses de vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5);
- **J5Ncont** (n= 39): grupo de novilhas controle, não receberam nenhuma dose da vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5);
- **J5N2** (n=53): grupo de novilhas vacinadas, receberam 2 doses da vacina contra *Escherichia coli* (Rotatec® - J5).

Para efeito de melhor entendimento, os animais dos grupos J5N, J5Ncont e J5N2 serão considerados, mesmo após o parto, como novilhas durante todo o período experimental.

3.3 Tratamento dos animais

O tratamento com antibiótico específico para vacas secas, à base de cloxacilina benzatina, foi realizado em todas as vacas, 60 dias antes do parto previsto, isto é, no dia da secagem. Após a ordenha e esgota completa das vacas, foi realizada desinfecção e antissepsia dos tetos com hipoclorito de sódio (pré-dipping); secagem dos tetos com papel toalha após 30 segundos; antissepsia do esfíncter do teto com algodão embebido em álcool 70% e infusão do medicamento, utilizando-se seringa de cânula curta. Após a aplicação do medicamento, foi realizada nova antissepsia com iodo (pós-dipping).

O tratamento de vacas, no dia da secagem, com antibiótico para vacas secas, foi realizado por ser considerada uma parte importante de um programa de controle de patógenos contagiosos, objetivando a resolução de infecções existentes e a prevenção de novas infecções intramamárias durante o período seco.

3.4 Imunização dos animais.

Para imunização dos animais, utilizou-se a vacina comercial Rotatec® - J5 (Biogénesis Bagó Saúde Animal Ltda). 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. Estudos anteriores demonstraram que esta concentração *Escherichia coli* J5 é eficaz em aumentar os níveis séricos de anticorpos em animais vacinados (González et al., 1989).

Os animais foram separados em grupos, como descrito anteriormente, e identificados de acordo com a numeração contida nos brinco auriculares. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições quanto às instalações, nutrição e ambiente, durante o período experimental.

A vacinação com Rotatec® - J5 obedeceu ao seguinte protocolo: três aplicações por via subcutânea na dose de 3 mL, aplicadas com seringa dosadora no terço médio do pescoço, após desinfecção do local com álcool iodado. Duas doses da vacina foram administradas no pré-parto, a primeira no dia da secagem e a segunda 30 dias após a primeira. A terceira dose foi administrada na primeira semana após o parto. As novilhas do grupo J5N2 receberam duas doses da vacina, a primeira 60 dias antes do parto previsto e a segunda 30 dias após a primeira.

As vacas que apresentaram período seco maior que 60 dias ou as que abortaram durante o período experimental foram excluídas do estudo.

3.5 Coleta de amostras

No momento da secagem e sete dias após o parto, foi realizada coleta de amostras de leite para diagnóstico microbiológico individual visando à identificação de patógenos causadores de mastite. As amostras de leite foram obtidas imediatamente antes da ordenha, após descartar os três primeiros jatos de leite, desinfetar os tetos com solução de hipoclorito de sódio e secagem dos mesmos com papel toalha descartável. No momento da coleta, realizou-se antissepsia do esfíncter do teto utilizando algodão umedecido em álcool a 70%. Os jatos foram retirados de tetos individuais, formando uma amostra única e composta, e acondicionados em frascos estéreis previamente identificados com o número do animal. O material amostrado foi congelado e, então, encaminhado em recipiente isotérmico, com gelo, ao laboratório Tecsa® em Belo Horizonte - MG para realização do diagnóstico microbiológico, isto é, isolamento e caracterização dos microrganismos.

Amostras de leite compostas e individuais, destinadas à contagem de células somáticas, foram coletadas mensalmente a partir do décimo dia de lactação segundo protocolo NMC (1999).

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 dois comprimidos do conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), permitindo sua conservação 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®).

Quando detectados casos clínicos de mastite, foram coletadas amostras para diagnóstico microbiológico no dia de ocorrência do caso clínico.

3.6 Diagnóstico microbiológico

3.6.1 Identificação dos microrganismos

O isolamento e caracterização dos microrganismos causadores de mastite foi realizado a partir das amostras de leite coletadas antes da ordenha e enviadas ao laboratório Tecsa® - Belo Horizonte – MG. Volumes de 10 µl de cada amostra foram semeados com alça calibrada e descartável em cada quadrante de uma placa de ágar-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).

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

3.6.3 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</i> sp.	-	+	v	+	+
<i>Streptococcus</i> sp.	-	-	-	-	-

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

3.6.4 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-negativo 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

3.7 Produção de leite

A produção de leite das vacas foi avaliada, mesalmente, a partir do décimo dia de lactação entre os meses de março a junho. A produção foi mensurada por meio de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha, nas ordenhas da manhã e da tarde, possibilitando, assim, a avaliação da produção individual e diária dos animais.

3.8 Monitoramento da ocorrência de mastite

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

A ocorrência de mastite clínica foi determinada pelo teste da caneca telada,

executado pelos funcionários responsáveis pela ordenha. Os casos clínicos de mastite foram classificados, de acordo com sua intensidade, em **grau 1** - apenas alterações visíveis no leite, isto é, coágulos; **grau 2** - presença de coágulos e inflamação no úbere; e **grau 3** - coágulos, inflamação no úbere e acometimento sistêmico (Bradley e Green, 2001).

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, iniciava-se o novo tratamento com a base 2 (dihidroestrepomicina, frameticina e prednisolona), também pelo mesmo período e, não havendo resposta, iniciava-se o tratamento com a base 3 (tetraciclina, neomicina, bacitracina 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 30 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 vacinados e não vacinados.

3.9 Análise estatística

Para as análises dos dados relacionados à produção, CCS e composição do leite (gordura, proteína, lactose), utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em sistema de parcelas subdivididas para 15 tratamentos em arranjo fatorial 5x3, ou seja, cinco grupos e três períodos de coleta, com os grupos na parcela e períodos de coleta na subparcela. Para tanto, realizou-se o teste de comparação de médias SNK pelo programa SAS (SAS,1999), ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Os dados de CCS foram transformados em $\text{Log}_{10}\text{CCS}$ para que os mesmos adquirissem distribuição normal.

A frequência de microrganismos na secagem, pós-parto e ocorrência de casos clínicos durante a lactação, bem como os dados relacionados à intensidade dos casos clínicos, foram analisados empregando-se análise de tabelas de contingência pelo Teste Exato de Fisher e a interação entre estes fatores foi analisada pelo Teste de McNemar. Para análise da intensidade dos casos clínicos também utilizou-se análise descritiva dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prevalência de infecções intramamárias na secagem e pós-parto

A Tabela 3 apresenta a prevalência de infecções intramamárias no pós-parto em novilhas vacinadas e não vacinadas.

Tabela 3. Prevalência de infecções intramamárias em novilhas vacinadas e não vacinadas após o parto.

Microrganismo		Pós-parto		
		J5N (n=39)	J5Ncont (n=39)	J5N2 (n=53)
E.coli	%	2,5 (1)	7,7 (3)	15 (8)
Negativo	%	64,2 (25)	59 (23)	62,4 (33)
Outros	%	33,3 (13)	33,3 (13)	22,6 (12)

J5N: novilhas vacinadas com 3 doses; J5Ncont: novilhas controle; J5N2: novilhas vacinadas com 2 doses.
Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher ($p>0,05$)

Em novilhas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação às infecções intramamárias no pós-parto e ($p>0,05$). Estes achados podem ser explicados, baseados em estudos anteriores, os quais reportaram que o risco de ocorrência de infecções intramamárias no início da lactação, independente do agente, é menor em novilhas e vacas jovens, apesar desta associação ainda não se encontrar completamente esclarecida (Green et al., 2002; Whist et al., 2006). Aparentemente, novilhas possuem os mecanismos de defesa naturais, da glândula mamária, bastante fortalecidos, uma vez que o enfraquecimento destes é causado por alterações anatômicas na glândula ao longo do tempo (Green et al., 2007), o que, juntamente a uma maior exposição à diferentes agentes, facilita a penetração de bactérias pelo canal do teto. Ainda, com o avanço das lactações, pode ocorrer redução

na capacidade de defesa do sistema imune (Fox, 2009), aumentando a suscetibilidade às infecções (Paganelli et al., 2006; Weng et al., 2006), o que não ocorre em novilhas. Assim, os resultados aqui expostos demonstraram que não houve influência da vacinação com *E.coli* J5 na prevalência de infecções intramamárias no pós-parto em novilhas, concordando com estudos anteriores, os quais indicam que os fatores de risco relacionados às infecções intramamárias, em novilhas no periparto, estão mais associados a outros tipos de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Streptococcus* sp. (Oliver e Sordillo, 1988; Svensson et al., 2006; Compton et al., 2007; Fox, 2009; Piepers et al., 2009).

A Tabela 4 apresenta a prevalência de infecções intramamárias, na secagem e pós-parto, em vacas vacinadas e não vacinadas.

Tabela 4. Prevalência de infecções intramamárias na secagem e pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas.

Grupo	Microorganismo					
	<i>E.coli</i>		Negativo		Outros*	
	SEC ¹	POS ²	SEC	POS	SEC	POS
J5V (n=96)	% 8,33 (8) ^A	1,04 (1) ^{aB}	37,50 (36) ^A	73,96 (71) ^B	54,17 (52) ^A	25,00 (24) ^B
J5Vcont (n=91)	% 10,98 (10) ^A	6,59 (6) ^{bB}	40,66 (37) ^A	61,54 (56) ^B	48,36 (44) ^A	31,87 (29) ^B

J5V: vacas vacinadas; J5Vcont: vacas controle

¹ SEC= Secagem

² POS= Pós-parto

^{a,b} Frequências seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, indicam diferenças estatísticas, entre grupos, pelo Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

^{A,B} Frequências seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferenças estatísticas significativas entre secagem e pós-parto, no mesmo grupo e para o mesmo microrganismo, pelo Teste de McNemar ($p < 0,05$).

* Nesta categoria estão incluídos os patógenos *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e Leveduras.

Analisando a prevalência de microrganismos na secagem e no pós-parto, observou-se que houve redução significativa ($p < 0,05$) na prevalência de *E.coli* no pós-parto, no grupo de vacas vacinadas (J5V), comparadas às não vacinadas (J5Vcont). No dia da secagem, 8,33% (8/96) das vacas do grupo J5V e 10,98% (10/91) das vacas do grupo J5Vcont apresentavam-se infectadas por *E.coli*. Após o parto, houve redução na porcentagem de animais infectados para 1,04% (1/96) em J5V e 6,59% (6/91) em J5Vcont, isto é, no pós-parto, vacas não vacinadas revelaram uma prevalência de *E.coli* significativamente superior ($p < 0,05$) à vacas vacinadas. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos outros patógenos ($p > 0,05$).

A análise estatística das diferentes prevalências de microrganismos na secagem e no pós-parto, em um mesmo grupo de vacas e para o mesmo agente (Tabela 4), foi realizada objetivando a comparação entre os períodos (secagem e pós-parto). Verifica-se que no grupo de vacas vacinadas (J5V) oito (8,33%) vacas apresentavam-se infectadas por *E.coli* no dia da secagem e, no pós-parto, apenas uma (1,04%) vaca permaneceu infectada, sendo

esta redução na prevalência de *E.coli* significativa ($p < 0,05$). Houve, ainda, aumento significativo ($p < 0,05$) de 36 (37,50%) para 71 (73,96%) no número de animais negativos, ou seja, aumento de 36,46% na quantidade de animais negativos, com redução na porcentagem de 54,17% para 25,00% animais infectados por outros agentes, na secagem e pós-parto, respectivamente. No grupo de vacas não vacinadas (J5Vcont), houve redução de 10,98% na secagem para 6,59% no pós-parto, em animais infectados por *E.coli*. Já os infectados por outros agentes apresentaram redução de 48,36% dos animais na secagem para 31,87% no pós-parto. Observa-se ainda aumento na porcentagem de animais negativos de 40,66% na secagem, comparado a 61,54% no pós-parto. Atribui-se esta diferença ao efeito do tratamento com antibiótico realizado no dia da secagem, isto é, à terapia de vacas secas e à ocorrência de cura espontânea, principalmente relacionada aos coliformes, geralmente presente durante o período seco. Este resultado evidencia a importância desta terapia na resolução de infecções pré-existentes e prevenção de novas infecções durante o período seco, especialmente, aquelas causadas por outros agentes que não os coliformes.

Em ambos os grupos, quando observados isoladamente, nota-se redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de animais infectados no pós-parto, com aumento na porcentagem de animais com resultados negativos na cultura microbiológica (Tabela 4). Apesar de não terem sido percebidas diferenças estatísticas significativas, entre os grupos, notou-se um aumento de 100% nos animais negativos na cultura microbiológica em vacas vacinadas (J5V), sendo este aumento de 50% em animais não vacinados (J5Vcont). Todas as vacas receberam antibiótico específico para vacas secas no dia da secagem, isto é, 60 dias antes do parto. No entanto, constata-se a ocorrência de melhores resultados, considerando-se o aumento em animais negativos, no grupo de vacas vacinadas (J5V). Este fato indica alguma contribuição da imunização com *E.coli* J5 na eliminação de infecções adquiridas durante o período seco, em especial as causadas por coliformes, visto que a proteção oferecida pela vacinação com *E.coli* J5 é atribuída ao aumento na concentração de anticorpos que possuem reação cruzada contra várias espécies de bactérias Gram-negativo (Hogan et al., 1992c).

O período pré-parto é identificado como um período crucial na aquisição de novas infecções intramamárias, principalmente coliformes, com mais de 60% destas ocorrendo neste período. Bradley e Green (2000), estudando a incidência de infecções intramamárias, por coliformes, adquiridas durante o período seco, verificaram que 97% das infecções por *E.coli* foram adquiridas nas duas últimas semanas antes do parto, sendo este período de grande risco devido à imunossupressão. Ainda, Todhunter et al. (1990) constataram que aproximadamente 67% das infecções intramamárias por *E.coli*, presentes no pós-parto, se originam do período seco, sendo 54,1% oriundas do final e 13,1% do início deste período.

Apesar da terapia de vacas secas não apresentar eficiência comprovada contra bactérias Gram-negativo, esta, efetivamente, é capaz de aumentar a taxa de cura em animais infectados por outros tipos de patógenos e prevenir a ocorrência de novas infecções durante o período seco (Bradley e Green, 2001a). Este fato torna-se evidente quando se observam os resultados do presente estudo em que, ambos os grupos, os quais foram tratados com antibióticos específicos para vacas secas no dia da secagem, apresentaram redução na prevalência de infecções causadas por outros tipos de microrganismos, de 54,17% na secagem para 25,00% no pós-parto em vacas vacinadas e de 40,45% na secagem para 31,87% no pós-parto em vacas não vacinadas.

Durante o período seco, em especial após o período de involução completa da glândula mamária, esta é parcialmente resistente às infecções devido aos altos níveis de lactoferrina presentes na secreção mamária (Bradley e Green, 2004). Esta proteína possui capacidade bacteriostática, principalmente, por tornar os níveis de ferro na glândula mamária indisponíveis (Green et al., 2002; Kutilla et al., 2003; Chaneton et al., 2008). Estudos realizados por Diarra et al. (2002) indicam, ainda, uma potente atividade bactericida da lactoferrina por meio do aumento da permeabilidade da membrana celular bacteriana e lesão da parede celular externa, particularmente, em bactérias Gram-negativo, podendo aumentar o efeito de alguns antimicrobianos. Este fato pode justificar os resultados aqui apresentados, nos quais nota-se a ocorrência de diminuição na porcentagem de vacas infectadas no grupo de vacas não vacinadas (J5Vcont), ainda que menos acentuada quando comparadas às vacinadas (J5V), podendo-se atribuí-la ao aumento na taxa de cura espontânea dos animais, presente no período seco pela ação da lactoferrina, bem como outros fatores

imunológicos inerentes ao animal nesta fase fisiológica (Burvenich et al., 2007), associada à terapia de vacas secas. Assim, verifica-se que o período seco é ideal para se conseguir uma completa sinergia entre a terapia antimicrobiana e a função imune para eliminação de patógenos da glândula mamária, sem incorrer nos elevados custos típicos das terapias para vacas em lactação. A ação da lactoferrina nas secreções mamárias é ainda maior contra bactérias Gram-negativo, em especial, *E.coli*, como demonstrado por Chaneton et al. (2008) que observaram que a inibição do crescimento *E.coli* depende das concentrações de lactoferrina na glândula mamária. Ainda, Todhunter et al (1990) verificaram que esta inibição pode ser otimizada pela presença de imunoglobulinas, uma vez que a combinação imunoglobulina e lactoferrina resultou em significativas reduções no crescimento de *E.coli*, comparadas a ação isolada da lactoferrina, indicando que os anticorpos presentes na secreção mamária que interagem com a lactoferrina são mais efetivos contra *E.coli*. Assim, de acordo com os achados aqui expostos e baseado nos estudos de Chaneton et al. (2008) e Todhunter et al. (1990), a redução observada, na prevalência de infecções intramamárias no pós-parto, resulta da associação entre as altas concentrações de lactoferrina e imunoglobulinas na glândula mamária durante o período seco, juntamente com sua capacidade bacteriostática, bem como sua capacidade em aumentar a eficiência do antibiótico de vacas secas. A interação entre estes fatores pode levar a um aumento na taxa de cura dos animais, limitando o estabelecimento de infecções intramamárias neste período.

Devido ao fato de vacas vacinadas (J5V) terem apresentado redução mais pronunciada na prevalência de *E.coli* no pós-parto, comparadas às não vacinadas (J5Vcont) e, ainda, de a lactoferrina apresentar otimização do potencial de ação quando associada às imunoglobulinas

(Todhunter et al., 1990), verifica-se que a vacinação com *E.coli* J5 pode ter influenciado na redução da prevalência de *E.coli* no pós-parto, potencializando a ação da lactoferrina e aumentando a taxa de cura espontânea. Esta potencialização se deve ao aumento nos níveis de anticorpos no colostro e nas secreções mamárias que reconhecem *E.coli*, devido a vacinação com *E.coli* J5, diminuindo a suscetibilidade dos animais em adquirir o agente no período pré-parto, como proposto por Tomita et al. (2000).

Apesar de não terem sido avaliados os títulos de imunoglobulina no presente estudo, pesquisas anteriores demonstraram que vacas vacinadas com *E.coli* J5 apresentaram títulos de IgM e IgG, nas secreções mamárias, maiores do que vacas não vacinadas, estando os mesmos relacionados ao aumento da capacidade fagocítica e opsonizadora para leucócitos e macrófagos. Este aumento está envolvido na prevenção da colonização da glândula mamária pelos organismos invasores e aumento da taxa de eliminação destes quando a infecção já se encontra estabelecida (González et al., 1989; Hogan et al., 1992). Assim, pelos resultados observados neste estudo, pode-se admitir a possibilidade de que o aumento nos títulos de anticorpos, em vacas vacinadas com *E.coli* J5, seja capaz de induzir uma proteção inicial, em vacas, antes do início do período de alto risco de aquisição de infecções intramamárias, isto é, o período pré-parto.

Todavia, o presente estudo contrasta com resultados obtidos em estudos anteriores, os quais não encontraram redução na prevalência de infecções intramamárias causadas por *E.coli* e pelo uso da imunização com *E.coli* J5 (Hogan et al., 1992 b; Hogan et al., 1992c; Clark e Van Rockel, 1994; Hogan et al., 1995; Tomita et al., 1998; Hogan et al., 1999; Smith et al., 1999). As discrepâncias observadas entre

este estudo e estudos anteriores são atribuídas, principalmente, às diferenças metodológicas entre os mesmos. A maioria destes estudos utilizou infecção experimental, isto é, inoculação intramamária de *E.coli* para avaliação da resposta animal, e não a avaliação da resposta baseada na infecção natural por este agente, como aqui apresentado.

Os achados deste estudo estão de pleno acordo com estudos prévios que avaliaram a eficiência da vacinação com *E.coli* J5 na prevenção da ocorrência de infecções intramamárias por *E.coli* no pós-parto, naturalmente adquiridas, em rebanhos comerciais e com a administração de três

doses da vacina (González et al., 1989; Cullor et al., 1991; Hogan et al., 1992; González et al., 1996), ou seja, a mesma metodologia aqui empregada. Assim como neste estudo, os anteriores também demonstraram a redução na prevalência de infecções causadas por *E.coli* no pós-parto em vacas vacinadas com *E.coli* J5.

4.2. Ocorrência de casos clínicos de mastite

A Tabela 5 apresenta a ocorrência de infecções intramamárias por *E.coli* que se tornaram clínicas no pós-parto em vacas vacinadas e não vacinadas.

Tabela 5. Infecções Intramamárias por *E.coli* que se tornaram clínicas no pós-parto, em vacas vacinadas e não vacinadas.

Grupos	Prevalência <i>E.coli</i> no pós-parto		IIM por <i>E.coli</i> que se tornaram clínicas	
	n	%	n	%
J5V (n=96)	1	1	0 ^a	0
J5Vcont (n=91)	6	6,5	4 ^b	66,6

J5V: vacas vacinadas; **J5Vcont:** vacas controle.

Frequências seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo Teste de McNemar ($p < 0,05$).

Considerando-se as infecções intramamárias por *E.coli* que se tornaram clínicas no pós-parto em vacas, observa-se que 66,6% (4/6) das vacas, positivas para *E.coli* no pós-parto e não vacinadas (J5Vcont), apresentaram casos clínicos de mastite por este agente no pós-parto imediato, isto é, no início da lactação. No grupo de vacas vacinadas (J5V) não houve manifestação do caso clínico no único animal positivo para *E.coli* no pós-parto. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Portanto, constata-se que, em vacas, a imunização com *E.coli* J5 é eficaz em reduzir a ocorrência de mastite clínica por *E.coli* no pós-parto imediato.

A Tabela 6 apresenta a ocorrência de mastite clínica por *E.coli* no período pós-parto em novilhas, vacinadas e não vacinadas, previamente infectadas por este agente.

Tabela 6. Infecções Intramamárias por *E.coli* no pós-parto que se tornaram clínicas em novilhas vacinadas e não vacinadas.

Grupos	Prevalência <i>E.coli</i> no pós-parto		IIM por <i>E.coli</i> que se tornaram clínicas	
	N	%	n	%
J5N (n=39)	1	2,5	0 ^a	0
J5Ncont (n=39)	3	7,7	3 ^b	100
J5N2 (n=53)	8	15	1 ^a	12,5

J5N: novilhas vacinadas com 3 doses; **J5Ncont:** novilhas controle; **J5N2:** novilhas vacinadas com 2 doses. Frequências seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo Teste de McNemar ($p < 0,05$).

Em novilhas, nota-se que 100% (3/3) das infecções intramamárias por *E.coli* tornaram-se clínicas em animais do grupo não vacinado (J5Ncont), comparado a nenhum animal do grupo vacinado (J5N) e 12,5% (1/8) do grupo de novilhas vacinadas com duas doses de *E.coli* J5 (J5N2). Assim, verifica-se que a imunização de novilhas com *E.coli* J5 é eficaz em reduzir a ocorrência de mastite clínica nos primeiros 100 dias de lactação, uma vez que a ocorrência de mastite clínica foi maior em animais não vacinados ($p < 0,05$) quando comparados aos animais vacinados.

Do total de casos clínicos no início da lactação, isto é, em vacas e novilhas (Tabelas 5 e 6), 10% (1/10) do grupo vacinado (J5V+J5N+J5N2) tornou-se clínico, enquanto dos não vacinados (J5Vcont+J5Ncont) 77,7% (7/9) das infecções por *E.coli* tornaram-se clínicas no pós-parto. Os grupos não vacinados apresentaram frequência de caso clínico por *E.coli*, no início da lactação, superiores aos grupos vacinados ($p < 0,05$).

Os resultados evidenciam a eficiência da vacina *E.coli* J5 na prevenção da ocorrência de casos clínicos de mastite no início da lactação, mesmo quando o animal já se encontra infectado por *E.coli* no pós-parto.

Esta prevenção pode ser justificada com base nos achados de Hogan et al. (1992a;1995), os quais verificaram que 66,7% das infecções intramamárias no pós-parto em vacas não vacinadas se tornaram clínicas nos primeiros 90 dias de lactação, comparadas a 20% em vacas vacinadas com *E.coli* J5. Os autores demonstraram que a imunização com *E.coli* J5 pode aumentar a capacidade de defesa do animal à infecção, por meio do estímulo da produção de anticorpos específicos contra antígenos de núcleo do LPS, os quais são comuns a todas as bactérias Gram-negativo, promovendo a eliminação do patógeno sem a apresentação de sinais clínicos (Burvenich et al., 2007). Ainda, Smith et al. (1999), utilizando a mesma metodologia empregada no presente estudo, observaram que, durante os primeiros 90 dias de lactação, as vacas vacinadas apresentaram risco cinco vezes menor de apresentação de mastite clínica por coliformes, quando comparadas as não vacinadas.

A Tabela 7 apresenta o total de casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação em vacas vacinadas e não vacinadas.

Tabela 7. Total de vacas que apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação.

Grupo	E.coli		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
J5V (n=96)	11	11,45	9	9,37	20	20,83 ^a
J5Vcont (n=91)	19	20,87	14	15,38	33	36,26 ^b

J5V: vacas vacinadas; **J5Vcont:** vacas controle.

Frequências seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Em vacas, quando comparados o grupo vacinado e não vacinado, considerando-se a ocorrência de casos clínicos totais, isto é, os resultados combinados de casos clínicos causados tanto por *E.coli* quanto negativos na cultura microbiológica, observa-se que o grupo de vacas não vacinadas (J5Vcont) apresentou maior número ($p < 0,05$) de casos clínicos totais (Tabela 7). Nota-se que 36,26% dos animais não vacinados apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação, comparados a 20,83% dos animais vacinados, ou seja, aproximadamente 15 pontos percentuais a menos do que o grupo não vacinado. Contudo, quando estratificados os dados na cultura microbiológica, ou seja, os casos clínicos causados por *E.coli* e negativos, isoladamente, não houve diferença estatística entre os grupos. As quantidades

de unidades formadoras de colônia (UFC) no leite, para bactérias Gram-negativo, são, muitas vezes, menores que 100 UFC/ml durante o caso clínico ou subclínico da doença, dificultando seu isolamento em determinadas circunstâncias. Conforme o exposto, os casos negativos na cultura microbiológica foram aqui considerados, uma vez que animais que apresentam casos clínicos de mastite, com resultado negativo na cultura microbiológica, podem estar infectados por *E.coli*, pelo fato da bactéria poder se encontrar metabolicamente inativa na amostra coletada, dificultando a identificação do agente (Hogan e Smith, 2003).

A Tabela 8 apresenta o total de casos clínicos de mastite, nos primeiros 100 dias de lactação em novilhas.

Tabela 8. Total de novilhas que apresentaram casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação.

Grupo	E.coli		Negativo		Total	
	n	%	n	%	N	%
J5N (n=39)	1	2,56	2	5,12	3	7,69
J5Ncont (n=39)	4	10,25	0	0	4	10,25
J5N2 (n=53)	2	3,77	3	5,66	5	9,43

J5N: novilhas vacinadas com 3 doses; **J5Ncont:** novilhas controle; **J5N2:** novilhas vacinadas com 2 doses.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher ($p > 0,05$).

Em novilhas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação ao total de casos clínicos de mastite nos primeiros 100 dias de lactação ($p > 0,05$). Os resultados aqui encontrados podem ser parcialmente elucidados pela ocorrência em que, geralmente, novilhas apresentam menor manifestação de casos clínicos de mastite do que vacas (Compton et al., 2007). A menor ocorrência de casos clínicos de mastite em novilhas reside no fato de que estas possuem a função de neutrófilos no sangue e no leite mais pronunciada, comparadas às vacas (Mehrzaad et al., 2004), bem como a capacidade de PMN em produzir compostos reativos de oxigênio, o que demonstra-se como o mais importante mecanismo de eliminação bacteriana intracelular (Burvenich et al., 2006; Mehrzaad et al., 2004). Na glândula mamária bovina, a manifestação clínica das infecções não se inicia até que as concentrações bacterianas atinjam determinado limite (Shuster et al., 1996). Logo, muitas das infecções intramamárias, presentes ao parto em novilhas, são eliminadas rapidamente, devido à maior viabilidade de PMN na eliminação da bactéria, antes que a doença possa se manifestar clinicamente (Piepers et al., 2009).

Muitas das infecções intramamárias, por bactérias Gram-negativo, adquiridas no fim do período seco, podem se manifestar como casos clínicos de mastite no início da lactação, devido ao comprometimento imunológico associado ao pós-parto (Bradley e Green, 2000; Burvenich et al.,

2007). Os resultados do presente estudo demonstram que a imunização de vacas, com *E.coli* J5 pode influenciar na redução da ocorrência de casos clínicos de mastite, tanto no momento pós-parto imediato, quanto nos primeiros 100 dias de lactação. Estes achados se justificam conforme proposto por Tomita et al.(2000), que relataram que o mecanismo de ação da vacinação com *E.coli* J5, contra as mastites clínicas causadas por *E.coli*, consiste na proteção por meio do aumento da opsonização do LPS bacteriano e aumento dos títulos de anticorpos séricos e no leite. Em um estudo de campo, altos títulos de IgG₁ no soro, contra *E.coli* J5, foram associados com diminuição na incidência de mastites clínicas por coliformes (Tyler et al.,1988). Este aumento na opsonização do LPS bacteriano promove uma maior migração de PMN para o interior da glândula mamária, além de aumentar a capacidade fagocítica dos mesmos, gerando maior eliminação de bactérias do interior da glândula e diminuindo a incidência de casos clínicos de mastite (Tomita et al., 2000;Burton e Erskine,2003; Burvenich et al., 2007).

4.3. Intensidade dos casos clínicos de mastite.

A Tabela 9 apresenta a intensidade dos casos clínicos de mastite, causados por *E.coli*, em vacas e novilhas, vacinadas e não vacinadas, ocorridos durante o período experimental.

Tabela 9. Intensidade dos casos clínicos de mastite, causados por *E.coli*, em vacas e novilhas durante todo o período experimental.

Grupo	Grau 1		Grau 2		Grau 3	
	n	%	n	%	n	%
J5V (n=20)	15	75	5	25	0	0
J5Vcont (n=33)	22	66	9	27	2	7
J5N (n=3)	2	66	1	34	0	0
J5Ncont (n=4)	1	33	3	67	0	0
J5N2 (n=5)	4	75	1	25	0	0

J5V: vacas vacinadas; **J5Vcont:** vacas controle; **J5N:** novilhas vacinadas com 3 doses; **J5Ncont:** novilhas controle; **J5N2:** novilhas vacinadas com 2 doses.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher ($p>0,05$)

Em vacas, verifica-se que apenas o grupo de vacas não vacinadas (J5Vcont) apresentou casos clínicos de grau 3, isto é, casos severos com sinais sistêmicos. Em 7% (2/33) dos casos clínicos de mastite neste grupo, houve manifestação de sinais sistêmicos, comparados a nenhum animal do grupo vacinado. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) com relação à intensidade (graus) dos casos clínicos entre os grupos vacinados (J5V) e não vacinados (J5Vcont). Porém, uma análise descritiva dos dados faz-se interessante devido à ausência de casos severos em animais vacinados. Uma redução, mais pronunciada, da intensidade dos sinais clínicos não pôde ser observada devido ao baixo número de casos clínicos causados por *E.coli* ocorridos durante o período experimental (65 casos clínicos em um total de 318 animais). Entretanto, é importante enfatizar que se trata de um estudo a campo, observando-se as infecções naturais pelo agente diferindo, portanto, de resultados obtidos em estudos com infecções experimentais, mas que estão de pleno acordo com estudos anteriores (González et al., 1989; Hogan et al., 1994, Hogan et al., 1995; Tomita et al., 2000). Estes reportam que mais de 90% das

infecções intramamárias experimentais levam ao desenvolvimento de casos clínicos agudos de mastite por *E.coli*, tanto em animais vacinados quanto em não vacinados, comparados a menos de 10% nas ocorrências naturais. Assim, embasado em estudos anteriores e pelos resultados aqui apresentados, sugere-se que a imunização com *E.coli* J5 pode ser eficaz em reduzir a intensidade dos sinais clínicos de mastite causados por *E.coli*, em vacas. Entretanto, estudos mais detalhados com a observação de maior número de casos clínicos são necessários.

Em novilhas, não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$), entre os grupos (J5N, J5Ncont e J5N2), quanto à intensidade de casos clínicos de mastite (Tabela 9). Nota-se que não houve apresentação de casos clínicos de mastite acompanhados de sinais sistêmicos (grau 3) em nenhum dos grupos, independentemente de estes serem vacinados ou não. Este fato foi observado também em diversos estudos que demonstraram a tendência em se verificar maior número de casos clínicos severos de mastite por *E.coli* em vacas (van Wernen et al.,1997; Mehrzad et al., 2001; Burvenich et al., 2003; Vangroenweghe et

al., 2004). Isto ocorre porque os neutrófilos são mais eficientes na eliminação de infecções em animais jovens, do que em animais com quatro ou mais lactações. Esta menor eficiência, em vacas, decorre da baixa migração de PMN e da diminuição mais pronunciada nos processos de reação oxidativa dos neutrófilos, próximo ao parto, tornando estes animais mais suscetíveis a ocorrência de casos clínicos severos no início da lactação (Burvenich et al., 2007).

O mecanismo pelo qual a vacinação com *E.coli* J5 atua, reduzindo a incidência e intensidade dos casos clínicos, ainda não é totalmente conhecido. Contudo, realizando a análise descritiva dos dados, os resultados aqui apresentados podem ser justificados, baseando-se em uma das hipóteses da eficácia da imunização com *E.coli* J5, em que a proteção oferecida pela vacinação, aparentemente, está relacionada ao aumento na produção de anticorpos específicos contra antígenos do núcleo do LPS e aumento na opsonização de bactérias (Dosgne et al., 2002; Hogan e Smith., 2003). O pico de contagem bacteriana e a intensidade dos sinais clínicos da doença são dependentes da rapidez e eficiência da resposta dos neutrófilos e da opsonização de bactérias pelos anticorpos (IgG e IgM), facilitando, assim, o reconhecimento destas para a fagocitose e, conseqüentemente, morte intracelular (Hogan et al., 1999; Tomita et al., 2000; Hogan & Smith, 2003; Burvenich et al., 2007; Wilson et al., 2007b). Assim, observa-se uma redução no número de bactérias no interior da glândula mamária, com subsequente redução na intensidade dos casos clínicos. No presente estudo, nota-se que apenas as vacas não-vacinadas (J5Vcont) apresentaram casos clínicos de mastite com manifestação sistêmica, demonstrando que a vacinação com *E.coli* J5, em vacas, pode promover uma eliminação eficiente da bactéria e neutralização do LPS, responsável pelos sinais sistêmicos dos casos clínicos de mastite causados por *E.coli*.

Outro fator que corrobora a hipótese aqui apresentada são os achados de Shafer-Weaver et al. (1999) e Wilson et al. (2007b), os quais demonstraram que os títulos séricos de IgG₁ e IgG₂ contra *E.coli* J5 são significativamente maiores em vacas vacinadas, comparadas as não vacinadas. Este fato, em especial o aumento dos títulos de IgG₂, favorece a formação da resposta imunológica do tipo 1, importante contra a mastite bovina, principalmente no início da infecção, uma vez que esta imunoglobulina auxilia na fagocitose da bactéria pelo neutrófilo pela rápida fixação do complemento (Burton et al., 2003). Sabendo-se que a resposta imunológica em vacas no início da lactação é predominantemente do tipo 2, esta mudança do tipo de resposta, com predominância da IgG₂, é extremamente benéfica na redução dos sinais clínicos. A viabilidade de maiores títulos de IgG₂ contra *E.coli* J5, imediatamente após a invasão bacteriana da glândula mamária, parece ser um dos maiores benefícios da vacinação com *E.coli* J5, principalmente se verificarmos que as concentrações desta imunoglobulina em vacas não vacinadas ocorre 12 horas após a invasão de *E.coli*, enquanto em vacas vacinadas este aumento ocorre em, aproximadamente, quatro horas (Shafer-Weaver et al. 1999). Portanto, estes achados explicam o fato de casos clínicos de mastite com sinais agudos terem ocorrido apenas em animais não vacinados, como apresentado neste estudo.

No entanto, mesmo com a utilização da vacina *E.coli* J5, observa-se que alguns animais vacinados apresentaram casos clínicos de mastite de grau 2 (Tabela 9), caracterizados pela presença de coágulos e sinais de inflamação no úbere com edema e aumento de temperatura. No grupo de vacas vacinadas (J5V), 25% dos animais apresentaram caso clínico de grau 2. Nas novilhas, 34% apresentaram caso clínico de grau 2 no grupo vacinado (J5N) e 20% no grupo vacinado com duas doses (J5N2).

Este fato é elucidado baseado em Dosgne et al (2002) que propuseram que há diferenças individuais entre os animais no que se refere a resposta à imunização com *E.coli* J5, podendo-se classificá-los em animais com alta ou baixa resposta à imunização baseado na magnitude da resposta de anticorpos contra *E.coli* J5. Aproximadamente um terço das vacas responde normalmente à imunização, enquanto dois terços dos animais demonstram um grau variável de resposta à imunização no periparto. Estes achados indicam que, neste período, há enfraquecimento da resposta de anticorpos a imunização ativa, havendo, portanto, aumento da suscetibilidade destes animais de baixa resposta a novas infecções, por *E.coli*, no período pré-parto. Portanto,

apesar da imunização com *E.coli* J5 ser eficaz em auxiliar na redução da intensidade dos sinais clínicos de mastite, como aqui apresentado, espera-se que, em rebanhos submetidos a altos desafios ambientais, casos de mastite moderados (grau 2) ou severos (grau 3) ocorram, mesmo após as imunizações.

4.4. Contagem de células somáticas e produção de leite.

A Tabela 10 apresenta as médias das contagens de células somáticas e produção de leite em vacas e novilhas vacinadas e não vacinadas, nos primeiros 100 dias de lactação.

Tabela 10. Média da contagem de células somáticas (log10 células/mL) do leite e produção de leite (Kg de leite/vaca/dia) de vacas e novilhas vacinadas e não vacinadas nos primeiros 100 dias de lactação.

Grupo	Variáveis (Médias ± s)	
	CCS (células/mL)	Produção (Kg leite/vaca/dia)
J5V (n=96)	4,75 ^a ±0,63	22,79 ^a ±7,09
J5Vcont (n=91)	4,80 ^a ±0,68	21,26 ^b ±6,04
J5N (n=39)	4,44 ^c ±0,67	20,74 ^b ±3,94
J5Ncont (n=39)	4,56 ^{bc} ±0,68	17,66 ^c ±4,48
J5N2 (n=53)	4,63 ^{abc} ±0,63	17,41 ^c ±4,07

J5V: vacas vacinadas; **J5Vcont:** vacas controle; **J5N:** novilhas vacinadas com 3 doses; **J5Ncont:** novilhas controle; **J5N2:** novilhas vacinadas com 2 doses.

s = desvio padrão

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem estatisticamente pelo Teste SNK (p<0,05)

Em vacas, não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) com relação à CCS nos animais vacinados (J5V) e não vacinados (J5Vcont). Em novilhas (J5N, J5Ncont e J5N2), também não foram observadas diferenças estatísticas (p>0,05).

Estes resultados concordam com Hogan et al. (1999) que, verificando a eficácia da imunização com *E.coli* J5 em infecções experimentais, também não observaram diferenças significativas na CCS do leite entre os grupos experimentais. Os autores

concluíram que a vacinação parece não ter efeito na magnitude da resposta da CCS ao desafio intramamário, uma vez que, a CCS após a manifestação do caso clínico retornou às concentrações pré-desafio 14 horas após o desafio intramamário com *E.coli*, tanto em animais vacinados quanto em não vacinados.

No entanto, é importante considerar que a maioria das infecções intramamárias causadas por coliformes, em especial *Escherichia coli*, são caracterizadas por serem de curta duração e frequentemente com manifestação clínica aguda. Visto que, neste estudo, foram realizadas apenas três avaliações da CCS dos animais, sendo as mesmas intercaladas de um mês, estas podem não ter sido suficientes para se avaliar o efeito da vacina *E.coli* J5 na redução da CCS, principalmente, após a manifestação do caso clínico de mastite. O efeito protetor da vacina pôde ser verificado baseado em relatos de Wilson et al. (2007b), que observaram que a CCS do leite de vacas vacinadas com *E.coli* J5, após desafio intramamário com *E.coli*, foi em média de 500.000 células/mL e 5.000.000 células/mL para vacas controle. Além disso, 30 horas após o desafio, as vacas vacinadas apresentaram redução na CCS para 300.000 células/mL, enquanto as controle apresentaram média de 2.000.000 células/mL. Esta redução na CCS é um importante indicador da menor reação inflamatória na glândula mamária de vacas vacinadas, demonstrando menor intensidade dos sinais clínicos associada aos efeitos da imunização com *E.coli* J5.

Em vacas, com relação à produção de leite, observou-se que as não vacinadas (J5Vcont) apresentaram média de produção de leite inferior ($p < 0,05$) às vacas do grupo vacinado (J5V) nos primeiros 100 dias de lactação (Tabela 10). Neste período, a média de produção de vacas não vacinadas (J5Vcont) foi de 21,26 Kg de leite/vaca/dia,

enquanto as vacinadas (J5V) apresentaram média de produção 22,79 Kg de leite/vaca/dia, ou seja, o grupo não vacinado produziu 1,53 Kg de leite/vaca/dia a menos, se comparado ao grupo vacinado. Em novilhas, verifica-se maior ($p < 0,05$) produção de leite no grupo vacinado com três doses de *E.coli* J5 (J5N), quando comparadas ao grupo não vacinado (J5Ncont) ou vacinado com duas doses (J5N2) (Tabela 10). As novilhas vacinadas com três doses (J5N2) apresentaram média de produção nos primeiros três meses de lactação de 20,74 Kg de leite/vaca/dia, comparada a 17,66 Kg de leite/vaca/dia e 17,41 Kg de leite/vaca/dia, nos animais do grupo não vacinado (J5Ncont) e vacinado com duas doses (J5N2), respectivamente. Logo, os grupos J5Ncont e J5N2 produziram 3,08 Kg de leite/vaca/dia e 3,33 Kg de leite/vaca/dia, respectivamente, a menos do que as novilhas imunizadas com três doses de *E.coli* J5 (J5N). Comparando-se a produção de leite em novilhas vacinadas com três doses da vacina (J5N), esta se apresentou superior às vacinadas com duas doses (J5N2) em aproximadamente 3,3 Kg de leite/vaca/dia. Assim, estes resultados demonstram que a utilização de três doses da vacina, ou seja, a realização de uma terceira imunização após o parto pode ser benéfica, considerando-se a maior produção de leite em novilhas vacinadas com três doses de *E.coli* J5. Porém, mais estudos são necessários, visando o esclarecimento da influência da vacinação com *E.coli* J5 na produção de leite, especialmente em novilhas.

Wilson et al. (2008) investigaram a associação entre a imunização com *E.coli* J5 e a produção de leite após infecções naturais por *E.coli*. Os autores relataram que a vacinação com *E.coli* J5 esteve associada à menor redução na produção de leite, após casos clínicos de mastite, em vacas vacinadas comparada às controles. Uma produção relativamente mais alta entre as vacinadas com *E.coli* J5 foi especialmente evidente em casos clínicos

de mastite com início nos primeiros 50 dias de lactação. Nestes casos, vacas vacinadas apresentaram produção de leite superior a vacas não vacinadas durante toda a lactação (aproximadamente 2 kg a mais). Cerca de três semanas após a manifestação do caso clínico de mastite, a produção de leite diária de vacas imunizadas foi aproximadamente 7 a 16 Kg maior que em vacas não vacinadas. Estes achados estão de acordo com os aqui expostos, nos quais, a imunização com *E.coli* J5 esteve associada à maior produção de leite nos três primeiros meses de lactação, tanto em vacas quanto em novilhas.

Os resultados aqui apresentados, em conjunto com os achados de Wilson et al. (2007b e 2008), indicam que a imunização com *E.coli* J5 está relacionada ao retorno mais rápido da produção de leite após o caso clínico, uma vez que ocorre redução na intensidade dos sinais clínicos, permitindo o restabelecimento das funções de produção da glândula mamária, com menores efeitos deletérios na produção de leite durante a lactação.

5. CONCLUSÕES

Em vacas, 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.

Em novilhas, a vacinação com *E.coli* J5 demonstrou-se eficaz em reduzir a ocorrência de casos clínicos causados por *E.coli*, mas não a intensidade dos mesmos nos primeiros 100 dias de lactação. A vacina também não foi efetiva em reduzir a prevalência de infecções intramamárias no pós-parto.

A contagem de células somáticas em vacas e novilhas não é alterada pela utilização da vacina *E.coli* J5.

Vacas e novilhas imunizadas com *E.coli* J5 produzem mais leite nos primeiros 100 dias de lactação. A utilização de três doses da vacina *E.coli* J5, em novilhas, resulta em maior produção de leite, neste período, do que o protocolo com administração de duas doses.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANNERMAN, D.D.; KAUF, A.C.W.; PAAPE, M.J.; et al. Comparison of Holstein and Jersey innate immune responses to *Escherichia coli* intramammary infection. *J. Dairy. Sci.*, v. 91, p. 2225-2235, 2008.

BAUMGARTNER, J.; HEUMANN, D.; CALANDRA, T.; et al. Antibodies to lipopolisaccharides after immunization of humans with the rough mutant *Escherichia coli* J5. *J. Infect. Dis.*, v.163, nº 4, p.769-772, 1991.

BERRY, E. 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.J. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* v. 164, p.116-128, 2002.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacteriaceae infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci.* vol.83, p.1957-1965, 2000.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* vol. 84, p.1632-1639, 2001a.

- BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microb.* v.39, p.1845-1849, 2001b.
- BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. The importance of nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet. Clin. Food. Anim.* vol 20, p.547-568, 2004.
- 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 coagulase-positivo isolados de mastite bovina. *Ciê. Rur.*, v.32, n.1, p.79-82, 2002.
- BORM, A.A.; FOX, L.K.; LESLIE, K.E.; et al. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.2090-2098, 2006.
- 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.; 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 MERRIS, V.; MEHRZAD, J. Severity of *E.coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* v.34, p.521-564, 2003.
- BURVENICH, C.; KHERLI, M.E.; PAAPE, J. Individual cow responses to *Escherichia coli* mastitis. IN: PROCEEDINGS OF THE 45th ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Tampa, FL. 2006. Disponível em: <http://www.nmconline.org>. Acesso em: 22 de jul. 2008.
- BURVENICH, C.; BANNERMAN, J., D.; LIPPOLIS, D.,J. Cumulative Physiological Infections During the Transition Period. *J.Dairy Sci* v.90, E. Suppl., p. E39-E54, 2007
- BURVENICH, C.; BANNERMAN, D.D.; LIPPOLIS, J.D.; cumulative physiological events influence the inflammatory response of bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* vol.90, p.E39-E54, 2008.
- CHAIYOTWITTAYAKUN, A.; BURTON, J.L.; WEBER, P.S.D. Hyperimmunization of steers with J5 *Escherichia coli* bacterin: effects on isotype-specific serum antibody responses and cross reactivity with heterogeneous gram-negative bacteria. *J. Dairy Sci.* v. 87, p. 3375-3385, 2004.
- CHANETON, L.; TIRANTE, L.; MAITO, J. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* v. 91, p.1865-1873, 2008.
- CHENG, J.B.; WANG, J.Q.; BU, D.P. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, vol.91(3), p.970-976, 2008.

- CLARK, P. e van ROEKEL, D. Efficacy of an *Escherichia coli* Bacterin for the Control of Coliform Mastitis in Dairy Cows. *Agri-practice*. v.15, p.19-25, 1994.
- COMPTON, C.W.R.; HEUER, C.; PARKER, K.; et al. Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.4157-4170, 2007.
- CULLOR, J.S. The *Escherichia coli* J5 vaccine: investigating a new tool to combat mastitis. *Vet. Med.* v.86, p.836-844, 1991.
- CULLOR, J.S. The role of vaccines in the prevention and moderation of clinical mastitis. IN: PROCEEDINGS OF THE 30th ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1991 (b). Disponível em <http://www.nmconline.org>. Acesso em: 22 de out. de 2008.
- 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.
- DETILLEUX, J.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. Mathematical model of the acute inflammatory response to *Escherichia coli* in intramammary challenge. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.3455-3465, 2006.
- DIARRA, M.S.; PETITCLERC, D.; LACASSE, P. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy. Sci.*, v.85, p.1141-1149, 2002.
- DINGWELL, R.T. Managements strategies for the prevention and elimination of intramammary infections in non-lactating dairy cows (Tese de doutorado). Guelph, Ontario. Universidade de Guelph. 2002.
- 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.30, p.75-89, 2004.
- DOPFER, D.; ALMEIDA, R.A.; LAM, T.J. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis *in vitro*. *Vet. Microb.* v.74, p.331-43, 2000.
- DOPFER, D.; NEDERBRAGT, H.; ALMEIDA, R.A.; et al. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet. Microbi.* v.80 (2001) p. 285-296, 2001.
- DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. Potencial mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *Vet. Res.*, v.33. p.1-12, 2002.
- ERSKINE, R.J. Enhancing immunity during the dry period: pitfalls and opportunities. IN: PROCEEDINGS OF THE 40th ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Reno-Nevada. 2001. Disponível em: <http://www.nmconline.org>. Acesso em 19 mai. 2008.
- FOX, L.K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet. Microb.*, v.134, p.82-88, 2009.
- GONZÁLEZ, R.; WILSON, D.; MOHAMMED, H.; et al. A placebo-controlled trial of an *Escherichia coli* J5 bacterin and ribotyping-based assessment of coliform bacteria diversity on a dairy farm. IN: PROCEEDINGS OF THE 19th WORLD BUIATRICS CONGRESS, 1996,

- Edimburgo, RU. *British Cattle Veterinary Association*, 1996. p.277-280.
- GONZÁLEZ, R.J.; CULLOR, J.S.; JASPER, D. 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.; 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.; BRADLEY, A.J.; MEDLEY, G.F., et al. Cow, Farm, and Management Factors During the dry Period that Determine the Rate of Clinical mastitis After Calving. *J. Dairy Sci.* v.90, p. 3764-3776, 2007.
- 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.
- HAGIWARA, S.; KAWAI, K.; ANRI, A.; et al. Lactoferrin Concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Clin. Pathol.* p.319-323, 2003.
- HALASA, T.; ØSTERÅS, O.; HOGEVEEN, H.; et al. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J. Dairy. Sci.* v.92, p.3134-3149, 2009.
- HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E.; et al. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection*. Arlington: NMC, 1990, 34p.
- 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.
- HASS, Y.; BARKEMA, H.W.; VEERKAMP, R.F. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *J. Dairy Sci.* v.85, p.1314-1323, 2002.
- 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. Vaccination of cows with rough *Escherichia coli* mutants fails to protect against experimental intramammary bacterial challenge. *Vet. Res. Commun.*, v.15, p.7-16, 1991.
- HILLERTON, J.E.; BRAMLEY, A.J.; SATKER, R.T.; et al. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J. Dairy Res.*, v.62, p.39-50, 1995.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; et al. Growth response of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.*,v.71, p.245-249, 1988.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H.; et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.*,v. 72, p.1547-1556, 1992 a.
- 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, 1992b.
- HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; TOMITA, G.M.; et al. Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after

- Escheria coli* J5 Vaccination. *J. Dairy. Sci.* v.75, p. 72-77, 1992c.
- HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* v.76, p.2795-2803, 1994.
- HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild coliform mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.285-290, 1995.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Importance of the dry period during *Serratia* mastitis outbreaks. *Large Anim. Pract.*, v.18, p.20-25, 1997.
- HOGAN, J.S.; BOGACZ, V.L.; ASLAM, M. 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.* vol. 34, p.507-519, 2003.
- HOGAN, J.S.; CANNON, V.B.; SMITH, K.L.; et al. Effects of adjuvants on safety and efficacy of an *Escherichia coli* J5 bacterin. *J. Dairy. Sci.* v.88, p. 534-542, 2005
- HUXLEY, J.N.; GREEN, M.J.; GREEN, L.E. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealant during the dry period. *J. Dairy Sci.* v.85, p.551-561, 2002.
- KHERLI, M.E. e HARP, J.A. Immunity in the mammary gland. *Vet. Vlin. North. Am. Food Anim. Pract.*, v.17, n° 3, p.495-516, 2001.
- KOMINE, K.; KOMINE, Y.; KUROISHI, T.; et al. Small molecule lactoferrina with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *J. Vet. Med. Sci.*, v.67, p.667-677, 2005.
- KREMER, W.D.J.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; LOHUIS, J.A.C. Host defence and bovine coliform mastitis. *The Veterinary Quarterly* v.12, p.2, 1990.
- KUTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; SALONIEMI, H. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Vet. Scan.*v.44, p.35-42, 2003.
- LeBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* v.89, p. 1267-1279, 2006.
- 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.
- LEINIGER, D.J. *Escherichia coli* mastitis in the dairy bovine.,2001, 75p. Dissertação (Mestrado em Veterinary Science) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- MAKOVEC, J.A. e RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.3466-3472, 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.
- MEGLIA, A.; JOHANNISSON, A.; PETERSSON, L.; et al. Changes in blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in perparturient dairy cow. *Acta Vet. Scand.*, v.42, p.139-150, 2001.
- MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Viability of milk

- neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy. Sci.* v.87, p. 4150-4162, 2004.
- MILTENBURG, J.D.; LANGE, D.; CRAUWELS, J.H.; et al. Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet. Rec.*, v.139, p.204-207, 1996.
- NELLS, M. e NISWANDER, C. Mouse monoclonal antibodies reactive with J5 lipopolysaccharide exhibit extensive serological cross-reactivity with a variety of gram-negative bacteria. *Infect. Immun.*, v.46, p.677-681, 1984.
- NICKERSON, S.C. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.187, n° 7, p. 41-45, 1985.
- NMC. *Laboratory Handbook on bovine mastitis*. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI, p. 171-173, 1999.
- OISHI, K.; KOLES, N.; GUELDE, G.; et al. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *J. Infect. Dis.*, v.165, p.34-45, 1992.
- OLDHAM, E.R.; EBERHART, R.J.; LANGE, A.L.; et al. Changes in bovine teat canal during the nonlactating period and early lactation, as measured by teat canal impressions. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.2075-2079, 1991.
- OLIVER, S.P. e SORDILLO, L.M. Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.2584-2606, 1998.
- PAGANELLI, R.; DI IORIO, A.; CHERUBINI, A.; et al. Frailty o folder age: the role of endocrine-immune interaction. *Curr. Pharm. Des.*, v.12, p.3147-3159, 2006.
- PASSEY, S.; BRADLEY, A.; MELLOR, H. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Vet. Microb.*, v.130, p.151-164, 2007.
- PIEPERS, S.; OPSOMER, G.; MEYER, E.; et al. Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis. *J. Dairy. Sci.* v.92, p. 4330-4339, 2009.
- PREISLER, M.T.; WEBER, P.S.D.; TEMPELMAN, R.J.; et al. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient period. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.14-19, 2000.
- PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. *Repro. Dom. Anim.* v.37, p.211-216, 2002.
- RAINARD, P. Experimental mastitis with *Escherichia coli*: sequential response of leucocytes and opsonic activity in milk of immunized and unimmunized cows. *Ann. Rech. Vet.*, v.14, p.281-286, 1983a.
- RAINARD, P. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrina concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into udder of immunized and unimmunized cows. *Ann. Rech. Vet.*, v.14, p.271-279, 1983b.
- 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.
- ROBERT, A.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. Incidence of intramammary infections

- during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows. *Vet. Res.*, v.37, p.25-48, 2006.
- SAMPIMON, O.C.; DE VliegHER, S.; BARKEMA, H.W.; et al. Effect of prepartum dry cow antibiotic treatment in dairy heifers on udder health and Milk production. *J. Dairy. Sci.* vol. 92, p.4395-4403, 2009.
- SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: statistics version 8. Ed 2. SAS Inst., Inc. Cary, NC, 1999.
- 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.
- 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.
- SCHUKKEN, Y.H.; HERTL, J.; BAR, D.; et al. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v.92, p.3091-3105, 2009.
- SHUSTER, D.E.; LEE, E.K.; KHERLI, M.E. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows, within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, p.1569-1575, 1996.
- SMITH, K. Mastitis control: a discussion. *J. Dairy. Sci.*, v.66, p.1790-1794, 1983.
- SMITH, K.L.; TOCHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy. Sci.* v.68, p. 402-417, 1985.
- SMITH, J.L.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; Efficacy of intramammary immunization with *Escherichia coli* J5 bacterin. *J. Dairy. Sci.* v.82, p.2582-2588, 1999.
- SMITH, K.L. e HOGAN, J.S. Environmental mastitis: know your opponent. IN: PROCEEDINGS OF THE 42nd ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Forth Worth, Texas, 2003. Disponível em: <http://www.nmconline.org>. Acesso em: 22 de jul. 2008.
- SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C. Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.* p. 49-1112, 1988.
- SORDILLO, L.M.; SHAFERWEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* v.80, p.1851-1865, 1997.
- SORDILLO, L.M.; STREICHER, K. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mam. Gland. Biol. And Neop.*v.7(2), p. 135-146, 2002.
- SORDILLO, L. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.* v.98, p.89-99, 2005.
- SURIYASATHAPORN, W.; DAEMEN, A.J.M.; NOORDHUIZEN, E.N.; et al. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.68, p.177-186, 1999.
- SVENSSON, C.; NYMAN, A-K.; PERSSON WALLER, K.; et al. Effects of housing, management, and health of dairy heifers on first lactation udder health in southwest Sweden. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.1990-1999, 2006.

- TODHUNTER, D.; 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. Intramammary Challenge with *Escherichia coli* following Immunization with Curli-Producing *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* v.74, p.819-825, 1991.
- TOMITA, G.M.; NICKERSON S.C.; OWENS, W.E. et al 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.
- TYLER, J.; CULLOR, J.; OSBURN, B.; et al. Relationship between serological recognition of *Escherichia coli* O111: B4 (J5) and clinical coliform mastitis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*,v.49, p.1950-1954, 1988.
- 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.
- VAN WERNEN, T.; NOORDHUIZEN, N.; DAEMEN, A.J.; 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.
- VANDEPUTTE-VAN MESSOM, G.V.; BURVENICH, C.; ROETS, E.; et al. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Res.*, v.60, p.19-29, 1993.
- VANGROENWEGHE, F.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J. Dairy Sci.*,v.87, p.886-895, 2004.
- VANGROENWEGHE, F.; LAMOTE, I.; BURVENICH, C. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domes. Anim. Endoc.* v.29, p. 283-293, 2005.
- VERBEET, M.P.; VERMEER, H.; WARMERDAM, G.C.; et al. Cloning and characterization of the bovine polymeric immunoglobulin receptor-encoding cDNA. *Gene*, v.164, n° 2, p.329-333, 1995.
- WAGTER, L.C.; MALLARD, B.A.; DEKKERS, J.C.M. Characterization of immune responsiveness and disease occurrence during the peripartum period. *J. Dairy Sci.*v.79, p.119-124, 1996.
- WEISS, W.P.; TODHUNTER, D.A.; HOGAN, J.S. Effect of duration of supplementations of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.73, p.3187-3194, 1990.
- WENG, N.P.; Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity*, v.24, p.491-494, 2006.
- 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.
- WHIST, A.C.; OSTERAS, O.; SOLVEROD, L. Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective dry cow therapy and teat dipping trial. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.4649-4659, 2006.

WILSON, M. The influence of preparturient intramammary vaccination on bovine mammary secretions. *Immunology*, v.23, p.947-955, 1972.

WILSON, D.J.; GONZÁLEZ, N. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* vol. 19, p.187-197, 2003.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J. 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.* vol.90, p.4282-4288, 2007.

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. 693-699, 2007.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J.; 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.

YANCY, R.J. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: facts and fiction. *Adv. Vet. Med.*, v.41, p.257-273, 1999.

ZIV, G. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.8, n° 1, p.1-15, 1992.