

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDERSON RIGO DOS SANTOS

**Efeito da antibioticoterapia intramamária combinada ou não a sistêmica em vacas
com mastite subclínica no momento da secagem**

LAGES, SC

AGOSTO, 2021

ANDERSON RIGO DOS SANTOS

**Efeito da antibioticoterapia intramamária combinada ou não a sistêmica em vacas
com mastite subclínica no momento da secagem**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa
Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração:
Produção Animal.

Orientador: André Thaler Neto
Co-orientador: Carlos Bondan

**LAGES, SC,
AGOSTO, 2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Santos, Anderson

Efeito da antibioticoterapia intramamária combinada ou não a sistêmica em vacas com mastite subclínica no momento da secagem / Anderson Santos. -- 2021.

46 p.

Orientador: André Thaler

Coorientador: Carlos Bondan

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

1. Antibióticos. 2. Associações. 3. Bovinos de leite. 4. Sinergismo. I. Thaler, André . II. Bondan, Carlos . III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

**EFEITO DA ANTIBIOTICOTERAPIA INTRAMAMÁRIA
COMBINADA OU NÃO A SISTÊMICA EM VACAS COM
MASTITE SUBCLÍNICA NO MOMENTO DA SECAGEM**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós – Graduação em Ciência Animal na Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Prof. Dr. André Thaler Neto
CAV – UDESC, Lages, SC.

Membro: _____

Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz
CAV – UDESC, Lages, SC.

Membro: _____

Dr. Leonardo Leite Cardozo
UFRGS, Porto Alegre, RS.

LAGES, SC,

AGOSTO, 2021

Agradecimentos

Agradeço á Deus pela saúde e proteção.

Agradeço aos meus pais Luis Antonio Gheller dos Santos e Bernadete Rigo dos Santos por todo esforço, dedicação e ajuda, durante toda minha vida.

Agradeço a meu Irmão Alessandro Rigo dos Santos, pelo companheirismo e ajuda.

Agradeço minha noiva Francieli Pedroso, pelo apoio incondicional, companheirismo e amor.

Agradeço meus avós Aleide Sebben Rigo e Joviniano Rigo (ambos *in memorian*) pelos exemplos de fé, dedicação, perseverança e humildade. Vocês são meus exemplos e jamais serão esquecidos.

Agradeço meu amigo André Macedo, por toda ajuda durante meu curso de mestrado. Obrigado pelo companheirismo e ajuda.

Agradeço o meu amigo Felipe S. Soares, por toda ajuda durante o experimento.

Agradeço o professor André Thaler Neto, por ter me dado a oportunidade de realizar meu sonho. Agradeço imensamente seu companheirismo, ajuda e orientação.

Agradeço o professor Carlos Bondan, pela ajuda e orientação.

Agradeço a Julia Thaler e Rainer Hauser por toda ajuda durante meu experimento.

Todos vocês terão minha eterna gratidão.

Muito obrigado !!!

Nunca deixe que
ninguém diga que
você não pode fazer
uma coisa. Se você
quer alguma coisa,
corra atrás.

Will Smith

Resumo

A mastite bovina é a doença mais preocupante e onerosa que afeta a pecuária leiteira ao redor do mundo, além de ser a principal causa do uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras. Estratégias para a prevenção da mastite bovina, veem sendo estudadas ao longo dos anos, a fim, de minimizar os impactos econômicos da doença dentro do sistema produtivo. Investimentos em estratégias preventivas, para a doença continuam sendo a melhor escolha. Dentre as estratégias de prevenção, a terapia da vaca seca é um dos pilares chaves para a diminuição da incidência de casos de mastite no período seco e no pós-parto, principalmente nas vacas com mastite subclínica na secagem. O objetivo do presente estudo, compreende avaliar o efeito da associação entre antibioticoterapia intramamária para vaca seca e antibioticoterapia sistêmica sobre a taxa de cura celular e bacteriológica de vacas com quarto mamário com mastite subclínica na secagem. No momento da secagem as vacas foram selecionadas obedecendo cinco critérios para participar do estudo: (1) ter um quarto mamário com escore maior ou igual a uma cruz no *California Mastitis Test*, (2) não ter sinal clínico de enfermidades, (3) ter período seco previsto de no mínimo 40 dias e no máximo 80 dias, (4) não estar com mastite clínica no momento da secagem e (5) não estar sob tratamento com antibióticos. As vacas de cada rebanho foram blocadas de acordo com a ordem de parto e escore no CMT, sendo distribuídas aleatoriamente a um dos seguintes tratamentos: os animais do grupo controle n= 31 (IMM) receberam na secagem somente terapia IMM, com antibiótico vaca seca a base de cloridrato de ceftiofur 500 mg (Spectramast vaca seca, Pfizer saúde animal) e selante de tetos a base de subnitrato de bismuto 4 gramas (Teatseal, Zoetis). O grupo tratado n= 31 (IMM + parenteral), recebeu além da terapia vaca seca, a aplicação em dose única, pela via intra-muscular de 4.4 mg/Kg de sulfato de gentamicina (Pangram, Virbac).

Vacas com mastite subclínica na secagem submetidas a associação entre antibiótico IMM com sistêmico tendem a apresentar menor ECS e redução de crescimento bacteriano no pós-parto. Mais estudos são necessários para confirmar este efeito. A perda de condição corporal entre a secagem e as primeiras semanas pós-parto, assim como quadros de hiperqueratose severa, provocam aumento do ECS no pós parto.

Palavras chaves: Antibióticos, Associação, Bovinos de leite, Sinergismo.

Abstract

Bovine mastitis is the most worrying and costly disease that affects dairy farming around the world. In addition, to being the main cause of the use of antimicrobials in dairy farms. Strategies for the prevention of bovine mastitis have been studied over the years to minimize the economic impacts of the disease within the production system. Investments in preventive strategies for the disease remain the best choice. Among the prevention strategies, dry cow therapy is one of the key pillars for reducing the incidence of cases of mastitis in the dry period and postpartum, especially in cows with subclinical mastitis at dry-off. The objectives of the present study, is to evaluate the effect of the association between intramammary antibiotic therapy for dry cows and systemic antibiotic therapy on the cellular and bacteriological cure rate of cows with a mammary quarter with subclinical mastitis at dry-off. At the time of drying, cows were selected according to five criteria to participate in the study: (1) have a mammary quarter with score greater or equal a one in the *California Mastitis Test*, (2) no clinical sign of disease, (3) dry period of at least 40 days and maximum 80 days, (4) without clinical mastitis at the time of drying and (5) not being treated with antibiotics. The cows in each herd were blocked according to the order of parturition and score in the CMT, being randomly assigned to one of the following treatments: animals in the control group n=31 (IMM) received only intramammary therapy in drying, with dry cow antibiotic 500 mg ceftiofur hydrochloride (Dry Cow Spectramast, Pfizer animal health) and 4 gram bismuth subnitrate teat sealant (Teatseal, Zoetis). The treated group n=31 (IMM + parenteral) received, in addition to dry cow therapy, a single dose of 4.4 mg/Kg of gentamicin sulfate (Pangram, Virbac) by intramuscular. Cows with subclinical mastitis during drying submitted to an association between intramammary antibiotic and systemic antibiotic during dry-off tend to have lower ECS and higher bacterial cure rate in the postpartum period. More studies are needed to confirm this effect. The loss of body condition between dry-off and the first weeks postpartum and severe hyperkeratosis causes an increase in ECS in the postpartum period.

Keywords: Antibiotics, Association, dairy cows, synergism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Valores médios \pm erro padrão da média (EPM) da ECS para os tratamentos nos momentos de coleta de amostra. Os valores médios no momento da secagem correspondem à covariável. 34

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Porcentagem de animais positivos para crescimento de bacteriano, nos diferentes períodos do estudo. | 34 |
| Tabela 2. Número de vacas por agente isolado no momento da secagem e nas três coletas após o parto..... | 37 |
| Tabela 3 - Média dos quadrados-mínimos \pm erro-padrão da média do Escorre de Células Somáticas (ECS) em função do Escorre de ponta de tetos (EPT)* | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECC – escorre de condição corporal

EC – escorre de caudicação

EHU – escorre de higiene de úbere

EPT – escorre de ponta de tetos

ECS - escorre de células somáticas

TVS – terapia da vaca seca

IMM- intra-mamário

IIMM- infecções intra-mamárias

EUA – Estados Unidos

CCS – células somáticas

CCST- contagem de células somáticas no tanque

CMT- *California Mastitis Tests*

SIT – selante interno de tetos

CIM – concentração inibitória mínima

PH- potencial de hidrogênio

MG – miligramas

KG- Kilogramas

SARLE- Serviço de análise de rebanhos leiteiros

UPF – Universidade de Passo fundo

ml – mililitros

IGF-I- Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 FATORES DE RISCO PARA MASTITE NA SECAGEM, PERÍODO SECO E PÓS-PARTO..... | 15 |
| 2.2. TERAPIA DA VACA SECA | 21 |
| 2.3 TERAPIA COMBINADA PARA TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA NA SECAGEM..... | 23 |
| 3 HIPÓTESES | 26 |
| 4 OBJETIVOS | 26 |
| 4.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 26 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 5 METODOLOGIA..... | 27 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 38 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais preocupante e onerosa que afeta a pecuária leiteira ao redor do mundo (Halasa *et al.*, 2007), além de ser a principal causa do uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras (Kromker, 2017). A indústria americana estima que cada caso de mastite custe ao redor de 444 dólares para as diferentes esferas do setor lácteo. Isso gera um prejuízo anual de 2 bilhões de dólares para o setor de leite americano (Rollin *et al.*, 2015). No Brasil estima-se que 12 a 15% da produção total de leite do país, seja perdida devido aos casos de mastite clínica e subclínica (Seegers, *et al.*, 2003). Isso representa uma perda anual superior a 4 bilhões de litros de leite, baseado em produção total de 35 bilhões de litros de produção total em 2019 (Brasil, 2020). O real impacto econômico da mastite bovina ainda é subestimado na maioria das propriedades rurais, pois são contabilizados apenas os custos diretos a doença, como tratamentos medicamentosos e descarte do leite os quais, representam somente 20 – 30% dos custos totais. Os custos indiretos da mastite bovina ocasionados pelas lesões no tecido mamário, as quais, diminuem a produção leiteira não são facilmente identificados pelos produtores e técnicos, entretanto, são os que causam as maiores perdas econômicas, pois estão relacionadas com redução da produção e perda da bonificação pela qualidade do leite (Huijps *et al.*, 2008). Segundo Bar *et al.*, (2008), o custo médio de um caso de mastite clínica para o produtor rural, se encontra na faixa de 179 dólares, onde os principais componentes desse custo médio são as perdas produtivas, custos com tratamento, descarte de leite e mortalidade, respectivamente.

Os investimentos em estratégias preventivas para a mastite bovina continuam sendo a melhor escolha. Dentre as estratégias de prevenção, a terapia de vaca seca (TVS) é uma importante medida, principalmente nas vacas com mastite subclínica na secagem. Além de apresentar melhores resultados de cura clínica em relação ao tratamento durante a lactação, a TVS dispensa o descarte de leite e minimiza os riscos de resíduos de antibióticos no leite (Spinosa *et al.*, 2017). Vários protocolos para tratamento de vaca seca usando antibióticos intramamários (IMM) de longa ação e selante de tetos, estão sendo empregados, com resultados promissores como os demonstrados por Martins *et al.* (2018).

Por outro lado, a proporção de quartos infectados com mastite clínica e subclínica durante o período seco e início da lactação se encontra próximo dos 20% (Cook *et al.*, 2005 e Pantoja *et al.*, 2009) representando uma grande fatia dos prejuízos causados pela

mastite bovina. Grande parte da alta taxa de vacas apresentando mastite clínica e subclínica durante o período seco e início da lactação deve-se ao uso de TVS ineficientes ou mal-empregadas.

Comumente se observa a campo o uso indiscriminado de antibióticos de vaca seca de longa ação associados a injetáveis, sendo que muitas vezes os antimicrobianos utilizados apresentam efeitos antagônicos entre eles. Esta falta de informação no campo, deve-se a deficiência de pesquisas, mostrando de forma clara, qual TVS deve ser empregada em casos de vacas com mastite subclínica na secagem e se a prática de associar antibióticos injetáveis com IMM de longa ação, apresentam algum benefício nestes casos.

Dessa forma, para avaliar protocolos de secagem com a associação de antibióticos, vacas com mastite subclínica na secagem devem ser utilizadas, as quais apresentam maiores riscos de desenvolver infecções intra-mamárias (IIMM) durante e/ou após o período seco. Este estudo tem o intuito de contribuir com avanços para o controle da doença mais incidente nos rebanhos leiteiros, visando, obter melhorarias na qualidade, produtividade e preço do leite pago aos produtores.

O presente estudo, tem por objetivo avaliar o efeito da associação entre antibioticoterapia intramamária para vaca seca e antibioticoterapia sistêmica sobre a taxa de cura celular e bacteriológica de vacas com quarto mamário com mastite subclínica na secagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Evidências históricas sugerem que o homem começou a ordenhar bovinos a 3100 A.C e desde lá são relatados casos de mastite (Nemet-Nejat, 1998). A mastite bovina compreende a doença mais antiga e estudada na bovinocultura leiteira mundial, devido a sua etiologia multifatorial, impacto econômico e risco a saúde pública. A mastite bovina pode ter causas físicas, químicas, fisiológicas e principalmente microbiológicas (Picoli *et al.*, 2014). A doença pode se apresentar de duas formas nos rebanhos leiteiros: clínica, onde a doença é visível ou subclínica, com sinais clínicos imperceptíveis. A forma subclínica da mastite apresenta maior prevalência nos rebanhos leiteiros em comparação a sua forma clínica (Costa *et al.*, 2001). Devido a sua evolução sem sinais clínicos, muitas

vezes passa despercebida pelos proprietários, levando a sérios impactos econômicos e sanitários (Coser *et al.*, 2012).

Várias pesquisas foram feitas para quantificar os prejuízos causados pela mastite subclínica. No entanto, não é fácil estimar com acurácia os reais impactos econômicos, pois na maioria das vezes são contabilizados apenas os custos diretos da doença com o custo terapêutico e de descarte do leite, sendo o principal impacto é a diminuição na produção leiteira, como sequela naqueles quartos mamários afetados pela inflamação (Hogeveen *et al.*, 2011). Vacas com mastite subclínica são reservatórios da doença e com isso, contaminam outros animais do rebanho e diminuem a qualidade do leite, sem a percepção do produtor, ocasionando sérias perdas econômicas dentro do sistema produtivo. Estudos demonstram que a contagem de células somáticas (CCS) compreende um marcador econômico dentro de propriedades leiteiras, sendo que quanto menor a CCS, maior o lucro da atividade. Segundo Gonçalves *et al.*, (2019), propriedades leiteiras com contagem de células somáticas de tanque (CCST) acima de 200.000 células/ml apresentam piores índices econômicos, quando comparado com propriedades com CCST abaixo de 200.000 células/ml. Devido aos impactos econômicos causados pela mastite subclínica, sólidos programas de controle e prevenção são buscados, visando a maior rentabilidade do sistema produtivo. Neste contexto, a secagem e o período seco compreendem um período de desafios e oportunidades. Desafios, pois o período seco inicial e final, representam um momento crítico para o desenvolvimento de novas infecções intra-mamárias (IIMM) (Cook *et al.*, 2005). Por outro lado, na secagem, temos a oportunidade de realizar a TVS, lançando mão de antibióticos de longa ação e associações antimicrobianas, prevenindo novos casos de mastite e curando casos pré-existentes (Netzke, 1981 e Bradley e Green, 2004).

2.1 FATORES DE RISCO PARA MASTITE NA SECAGEM, PERÍODO SECO E PÓS-PARTO

A secagem e o período seco final representam o momento mais crítico para o desenvolvimento de casos clínicos de mastite (Robert *et al.*, 2006 e Smith *et al.*, 1985). No início do período seco as vacas são seis vezes, mais pré-dispostas a desenvolver infecções IIMM, quando comparado a lactação (Smith *et al.*, 1985). Essa maior incidência de novos casos de mastite, no período seco inicial e final, é atribuída a mudanças anatômicas e fisiológicas que ocorrem na glândula mamária e no organismo da

vaca leiteira no período de transição (Church *et al.*, 2008). Além das alterações na glândula mamária provocadas pela interrupção das ordenhas, a qual provoca desconforto nos animais, devido ao aumento da pressão intra-mamária, alterações hormonais, metabólicas e imunológicas são observadas em vacas no período de transição (Bruckmaier e Gross, 2017). Estas alterações fisiológicas, deixam os animais, predispostos a doenças infecciosas, dentre elas a mastite, sendo observada maior frequência de mastite clínica causada por coliformes no início da lactação. Isso, está associado à menor capacidade de resposta imune da vaca na transição, pois estima-se que 75% dos casos de doenças, que acometam as vacas leiteiras, ocorram no período de transição e dentre elas, destaca-se a mastite (Santos *et al.*, 2019).

Estudos norte-americanos têm estimado uma proporção de quartos infectados no período seco na faixa de 8 – 25% para mastite clínica (Cook *et al.*, 2005) e 13 – 35 % para mastite subclínica (Pantoja *et al.*, 2009). Esta alta proporção de quartos mamários infectados durante o período seco, está ligado a vários fatores, que vão desde o manejo na secagem até o ambiente na maternidade.

O manejo de secagem de vacas leiteiras pode ser realizado de duas formas: secagem abrupta e secagem intermitente. A secagem abrupta, compreende a interrupção imediata da ordenha. Logo após a ordenha completa da glândula mamária, é realizado a TVS e /ou aplicação de selante de tetos (NMC, 2006). Por outro lado, na secagem gradual é diminuído a frequência de ordenha, para uma ordenha diária, durante uma semana, sendo posteriormente realizado a TVS e /ou selante de tetos (Newman *et al.*, 2010). Gott, *et al.*, (2016), compararam o efeito dos dois métodos de secagem sobre a frequência de mastite no período seco e no pós-parto, não encontrando diferença na taxa de IIMM entre os métodos. No entanto, Rajala-Schultz *et al.*, (2018), observaram maior desconforto de vacas de alta produção secas pelo método abrupto. O aumento de pressão mamária, causado na secagem abrupta, provoca maior estresse no animal, acarretando mudanças em seu comportamento, especialmente aumentando a frequência de mugidos e diminuindo o tempo de descanso, porém sem afetar a ocorrência de novos casos de mastite clínica.

Segundo estudos de Pantoja *et al.* (2009), os principais fatores predisponentes para desencadear casos de mastite clínica e subclínica no período seco e início da lactação são o isolamento bacteriano positivo e CCS acima de 200.000 células/ml no momento da secagem. A CCS é comumente utilizada como um indicador de saúde da glândula

mamária, sendo que ela reflete a resposta imunológica do órgão e com isso, a presença de IIMM. Essa ferramenta de monitoramento do status imune da glândula mamária, indica a presença de inflamação, quando uma amostra proveniente dos quatro quartos mamários apresentar CCS acima de 200.000 células/ml, com sensibilidade e especificidade de aproximadamente 70% (Schepers *et al.*, 1997). De acordo, com Pantoja *et al.*, (2009), vacas que apresentam CCS acima de 200.000 células/ml de leite no momento da secagem, possuem maior risco de desenvolver mastite clínica nos primeiros 120 dias de lactação. Estudos sugerem, que entre 23 a 38% dos casos de mastite que ocorrem nos primeiros 100 dias de lactação tem ligação direta com patógenos que foram isolados na secagem ou no período seco (Bradley e Green, 2000). Rebanhos leiteiros com alta incidência de casos clínicos de mastite durante a lactação ou com CCS acima de 200.000 células/ml, são mais susceptíveis a desenvolver mastite no período seco e nos primeiros meses da lactação subsequente (Green *et al.*, 2007). Segundo Pantoja *et al.*, (2009), vacas com histórico de mastite clínica nos últimos 60 dias de lactação e com alta CCS na secagem, apresentam maior risco de desenvolver quadros de mastite no período seco.

Entretanto, os efeitos dos casos de mastite ocorridos na lactação anterior, não impactam somente no período seco. Estudos demonstram, que casos clínicos e subclínicos de mastite ocorridos na lactação anterior, elevam a CCS e o número de casos clínicos de mastite nos primeiros 60 dias da lactação subsequente. Aqueles quartos mamários que foram acometidos por pelo menos um caso de mastite na lactação anterior, apresentam 4.2 vezes maior risco de desenvolver mastite clínica, em comparação com aqueles quartos mamários que não foram acometidos, por casos clínicos de mastite. Quartos mamários com CCS maior de 200.000 células/ml no momento da secagem e no pós-parto, são 20 vezes mais susceptíveis a se infectar com um patógeno de alto impacto, em relação a vacas com CCS abaixo de 200.000 células/ml, nestes dois momentos (Pantoja *et al.*, 2009). A presença de infecções subclínicas no momento da secagem é um fator que contribui para a ocorrência de mastite clínica no período seco, bem como, nos primeiros meses da lactação subsequente. Alguns estudos têm investigado o efeito de IIMM no período seco, sobre o risco de mastite clínica na lactação subsequente, especialmente nos primeiros 3 meses. Green *et al.*, (2002) demonstram, que 38% dos casos clínicos de mastite que ocorrem na lactação subsequente ao período seco, tem origem de patógenos que foram isolados de amostras de leite coletadas na secagem ou no período seco. Outros estudos, demonstram que aproximadamente 45% dos casos clínicos de mastite que se

desenvolvem até os 100 dias de lactação, tem origem de enterobacterias, as quais foram isoladas, durante o período seco (Bradley e Green, 2000).

Outro fator que impacta de forma significativa no desenvolvimento de novas IIMM, compreende a contaminação dos quartos mamários com patógenos ambientais. A mastite bovina, como a maioria das doenças infecciosas, depende de três pilares chaves para a sua ocorrência: exposição a patógenos, mecanismos de defesa da glândula mamária e fatores ambientais. Os fatores relacionados ao ambiente, onde os animais ficam no período seco e peri-parto, tem grande impacto sobre a ocorrência de novos casos de mastite de origem ambiental, pois as vacas permanecem grande parte do seu tempo deitadas após a secagem (Gomez *et al.*, 2010 e Neave *et al.*, 1969). Estima-se, que ao redor de 10-17% dos novos casos de mastite no período seco, tem etiologia de patógenos de origem ambiental (Pantoja *et al.*, 2009). Essa, alta incidência de mastite clínica no período seco, por patógenos ambientais, tem ligação direta com o ambiente e manejo que os animais são expostos após a secagem e no peri-parto (Jones, 2009). Animais nestes períodos devem ser colocados em ambientes com baixa exposição e crescimento microbiano. O reservatório dos microrganismos ambientais é o ambiente onde as vacas estão alojadas. Fatores como: estação do ano, superlotação, acúmulo de sujidades, falta de reposição das camas e baixa frequência de limpeza dos corredores, estão associados ao alto grau de contaminação da pele dos tetos (Green *et al.*, 2007). A redução da contaminação dos tetos, compreende um dos princípios básicos para controle da mastite, pois há relação direta entre prevalência de mastite com pobre escorrede de higiene de úbere e pernas (Santos *et al.*, 2019). A exposição e quebra de defesas inatas, as quais, predispõe os animais a infecções oportunistas, pode se iniciar no procedimento de secagem. Estudos demonstram, que o tamanho da cânula para colocação do antibiótico IMM, predispõe os animais a quadros de mastite. A inserção de cânulas maiores de 4 mm no canal do teto, provoca dilatação excessiva do lúmen da cisterna do teto e conseqüentemente aumenta a exposição a patógenos ambientais (Boddie e Nickerson, 1986 e Leelahapongsathon *et al.*, 2016). A inserção parcial das cânulas, resultam em menores danos na camada protetiva de queratina e com isso, reduz o grau de distensão do canal do teto, diminuindo o risco de lesão e de introduzir um patógeno para dentro do lúmen mamário (McDougall, 2003).

A duração do período seco compreende outro fator que predispõe os animais a novos casos de mastite. Observou-se que períodos secos muito longos (143 – 250 dias) possuem um impacto significativo na CCS, quando comparado a períodos secos

convencionais (53 – 76 dias) (Pinedo *et al.*,2011). Por outro lado, Green *et al.*, (2007), não observaram diferença na incidência de mastite subclínica entre períodos secos longos e curtos, sugerindo que fatores de manejo e de saúde da glândula mamária tem maior impacto sobre a CCS. Animais com período seco prolongado (acima de 90 dias), geralmente tiveram problema reprodutivo na lactação anterior, elevando seu DEL (dias em lactação) e com isso, foram secas devido a sua baixa produtividade. Esses animais, na maioria das vezes, chegam ao parto com elevado escore de condição corporal (ECC), acima de 3.25. Vacas que chegam ao parto com elevado ECC, possuem uma maior perda de peso, em relação aos animais com ECC menor de 3.25, devido a sua menor ingestão de matéria seca no pós-parto (Ingvarsen *et al.*,2013), com conseqüente perda acentuada de peso, podendo levar a hipercetonemia. O aumento dos corpos cetônicos na corrente sanguínea, tem sido correlacionado em vários estudos, com depressão da reposta imunológica. Vacas com lipomobilização excessiva, possuem um balanço energético negativo acentuado, com baixos níveis de glicose na corrente sanguínea. Essa hipoglicemia associada a hipercetonemia, leva os animais a quadros de imunossupressão. A imunidade dos animais é prejudicada nestes casos, pois os neutrófilos, os quais, são a primeira linha de defesa do sistema imune, utilizam preferencialmente glicose e glutamina como substratos energéticos (Aleri *et al.*, 2016). Devido aos baixos níveis destes metabólitos no sangue, as vacas com cetose, seja ela clínica ou subclínica, fica propensas a doenças infecciosas (Suriyasathaporn *et al.*, 2000).

Durante o período de transição, que compreende as três semanas antes do parto, até as três primeiras semanas de lactação, as vacas leiteiras passam por inúmeros desafios metabólicos, que interferem de forma negativa na sua imunidade, lhes deixando predispostas a doenças infecciosas. Aumento do cortisol plasmático, baixa nos níveis séricos de cálcio e glicose, aumento dos AGL (ácidos graxos livres), aumento do estresse oxidativo e diminuição da IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I), são as principais mudanças, que comprometem o sistema imunológico das vacas leiteiras no período de transição. O aumento do cortisol, ocasiona uma diminuição das moléculas de adesão nos tecidos, impedindo a diapedese dos polimorfonucleares (PMN), para os tecidos alvos. A baixa da glicose e do cálcio, levam a uma diminuição da ativação dos PMN e do burst oxidativo. O aumento dos AGL e da liberação de radicais livres, ocasiona lesões nas membranas celulares, levando essas células a apoptose. Por sua vez, a baixa na

liberação da IGF-I, leva ao desacoplamento do eixo somatotrópico e diminuição da proliferação e diferenciação celular (Chebel, *et al.*, 2018).

A produção de leite na secagem, compreende outro fator, que pode deixar as vacas mais predispostas a desenvolver novas IIMM, principalmente no período seco inicial. Segundo Rajada Schuzt *et al.*, (2005) as vacas com alta produção de leite na secagem são animais predispostos a desenvolver quadros de mastite ambientais. Isso acontece devido a maior pressão IMM exercido pelo acúmulo de leite e também está relacionada a um retardo na formação do tampão de queratina. Isso, favorece a entrada de microrganismos para o lúmen mamário e conseqüentemente desencadeia quadros clínicos de mastite. No entanto, essa maior susceptibilidade acontece em vacas com produção acima de 12.5 kg/dia na secagem. A cada 5 kg a mais produzidos por estes animais no momento da secagem, aumenta o risco de IIMM em 77%. Por outro lado, vacas com produção muito baixa na secagem e com DEL elevado também possuem riscos maiores de desenvolver quadros clínicos de mastite (Natzke *et al.*, 1975). Segundo Pinedo *et al.*, (2012) vacas com baixa produção na secagem possuem aumento da incidência de casos clínicos e subclínicos de mastite. Isso, está ligado a uma baixa nas defesas inatas na glândula mamárias destes animais.

Lesões que acometem as extremidades dos tetos, são fatores, que deixam os animais pré-dispostos a desenvolver novos quadros de mastite, seja na lactação ou no período seco. Várias lesões podem acometer as extremidades dos tetos, tais, como eversão da ponta, rachaduras, prolapso entre outras. No entanto, a hiperqueratose é a principal alteração que ocorre no canal do teto (Sousa, 2008). Hiperqueratose significa “crescimento exagerado de queratina” (Mein *et al.*, 2001), ou seja, é um espessamento da pele que forma o canal do teto e circunda o exterior do orifício do teto (Neijenhuis *et al.*, 2000). É uma resposta fisiológica frente às forças aplicadas à pele do teto durante a ordenha, tanto pelo fechamento da teteira de um equipamento de ordenha, ou por uma força desnecessária feita pelo ordenhador (Neijenhuis e Koning; *et al.*, 2001). Animais que apresentam escorrede de ponta de tetos acima de dois, possuem lesão na estrutura interna do teto, a qual é composta por musculatura lisa que envolve o canal e o esfíncter do teto, sendo essa responsável por mantê-lo fechado, impedindo assim a perda de leite e servindo como a primeira linha de defesa da vaca contra as IIMM. Quando, se tem a presença de hiperqueratose a primeira barreira inata do animal, contra casos de mastite, está lesionada, predispondo os animais a novas IIMM (Birten e Alaçam, 2015). Pantoja

et al., (2020), em revisão realizada demonstrou que a hiperqueratose severa, predispõe os animais a quadro de mastite clínica e subclínica, tanto por agentes ambientais como contagiosos. A integridade da extremidade dos tetos é fundamental para diminuir o risco de mastite em vacas leiteiras, já que estudos demonstram, correlação positiva entre altos escorres de pontas de tetos e CCS (Mulei, 1999, Gleeson *et al.*, 2004; Cardozo *et al.*, 2015).

2.2. TERAPIA DA VACA SECA

Estratégias para a prevenção da mastite bovina, veem sendo estudadas ao longo dos anos, a fim, de minimizar o impacto econômico da doença dentro do sistema produtivo, pois os investimentos em estratégias preventivas para a mastite bovina continuam sendo a melhor escolha. Estudos demonstram, que o tratamento de casos clínicos de mastite é 15 X mais oneroso, em comparação a investimentos em medidas preventivas (Hagnestam-Nielsen C. *et al.*, 2009).

Dentre as estratégias de prevenção da mastite, a TVS é um dos pilares chaves para a diminuição da ocorrência da doença nas propriedades, principalmente nas vacas com mastite subclínica na secagem. A TVS faz parte do programa dos 5 pontos para o controle da mastite bovina desenvolvido no Reino Unido (Neave *et al.*, 1969) e posteriormente expandido para o programa de 10 pontos dos Estados Unidos da América (EUA) (NMC, 2015). A prática da TVS se iniciou em 1930 na universidade de Cornell nos EUA, administrando acriflavina no momento secagem de vacas leiteiras (Johnson, 1941). No entanto, o início do manejo de secagem de vacas leiteiras é atribuído aos trabalhos de Person em 1950, o qual buscou um método para a prevenção da alta incidência de casos clínicos de mastite, que estavam ocorrendo no período seco, na estação do verão, tendo como etiologia o *Corynebacterium pyogenes*.

Como alternativa, se usou uma solução aquosa de penicilina sódica, pela via IMM. No entanto, não se obteve sucesso com a terapia, pois a droga persistiu, por apenas alguns dias na glândula mamária. Mas tarde, foram realizados estudos, com a infusão IMM de penicilina oleosa. Nestes ensaios, se reduziu em 47% a incidência de mastite no período seco. Isso ocorreu devido a adição de alumínio monoestearato, o qual confere uma maior persistência do medicamento na glândula mamária.

A TVS consiste na infusão IMM de antibiótico de longa ação em todos os quartos mamários no momento da secagem, com a associação ou não de antibióticos parenterais. Mais recentemente, se incluiu nos procedimentos de secagem o uso do selante interno de tetos. O objetivo da TVS compreende a prevenção de novas infecções e cura de infecções existentes (Oliver *et al.*, 2004). Com o intuito de prevenir a invasão de patógenos para o sistema mamário, recentemente incluiu-se nos protocolos para tratamento de vaca seca o selante interno de tetos (SIT). O SIT tem na sua composição subnitrato de bismuto, cuja função principal é a vedação da cisterna do teto, impedindo o acesso de microrganismos até a cisterna da glândula, principalmente, em momentos de maiores desafios para a glândula mamária. Alguns estudos evidenciaram um atraso na formação do tampão de queratina ao longo do período seco, sendo este um fator determinante para a ocorrência de novas IIMM, principalmente em vacas de alta produção na secagem (Golder *et al.*, 2016). O uso dos SIT, quando associado com a antibioticoterapia IMM de longa ação, tem se mostrado mais efetivo na prevenção de novos casos de mastite clínica em todo o período seco e no pós-parto imediato (Martins *et al.*, 2017). Em uma meta-análise sobre a eficiência do SIT associado ou não ao antibiótico de vaca seca, concluiu-se que o uso do SIT reduz o risco de infecções em 25% imediatamente após o parto se comparado ao uso apenas do antibiótico no período em que é realizado a secagem (Rabiee e Lean, 2013). Esse efeito benéfico exercido pelo SIT, tem relação com a permanência destes selantes no pós-parto, segundo estudos relatados por alguns autores, os selantes, permaneceram em cerca de 83% das vezes após a primeira ordenha (Kabera *et al.*, 2018). Portanto, mesmo após o parto, temos contribuições dos SIT para redução da incidência de mastite. Além da prevenção de novas infecções mastíticas, o uso do SIT, combinado com o antibiótico de vaca seca, resulta em melhoria da saúde do úbere e qualidade do leite, pois observou-se diminuição da CCS logo após o parto, quando comparado, com a TVS antimicrobiana somente (Molina *et al.*, 2017 e Machado e Bicalho, 2018).

O controle da mastite bovina baseia-se em dois princípios básicos: medidas de prevenção para novos casos e eliminação dos casos existentes. As principais ferramentas para eliminar os casos existentes de mastite, compreendem o descarte ou segregação de animais infectados, cura espontânea e principalmente tratamentos com antimicrobianos na lactação e no período seco (Hillerton *et al.*, 2018). Nos casos da mastite subclínica a recomendação internacionalmente aceita é efetuar o tratamento seja pela via sistêmica e/ou IMM no momento da secagem, devido aos custos e riscos que o tratamento durante a lactação apresenta. Custos com diagnóstico, medicamentos, descarte de leite, proporção

do medicamento que será diluído e eliminado com o leite na ordenha subsequente e a menor taxa de cura bacteriológica, quando comparado a TVS, fazem com que o tratamento da mastite subclínica na lactação seja considerado na atualidade antieconômico (Barkema *et al.*, 2006).

Na TVS emprega-se antimicrobianos formulados a base de óleo mineral com monoestearato de alumínio a 3% e sais insolúveis. Isso, confere aos antibióticos liberação lenta e conseqüentemente, um maior período de atuação na glândula mamária com doses mais elevadas em comparação ao tratamento durante a lactação. Melhores resultados em termos de cura bacteriológica e celular são obtidos com a TVS. Além de ser uma estratégia indispensável para a prevenção de novos casos de mastite durante o período seco. Estudos demonstram que a taxa de cura média para mastite subclínica com o uso da TVS gira ao redor de 80 – 90% (Cameron *et al.*, 2016). Além disso, animais que passaram pelo período seco, sem receber antibioticoterapia na secagem, ficaram quatro vezes, mais predisponentes a desenvolver novas infecções durante este período (Martins *et al.*, 2017). Além do maior período de persistência no tecido mamário, os antimicrobianos empregados na TVS apresentam as seguintes características: ação bactericida, alto peso molecular, não irritante ao tecido mamário, alto grau de ligação às proteínas e estabilidade em relação à atividade antimicrobiana. A adoção da antibioticoterapia para mastite deve visar à eficácia terapêutica e benefícios econômicos, tanto do ponto de vista do aumento da produção, como na redução de quartos mamários infectados. Um programa efetivo de controle da mastite bovina deve ter como base, principalmente, as medidas de prevenção. É importante utilizar a TVS, com o objetivo de auxiliar as defesas específicas e inespecíficas do animal na eliminação do microrganismo invasor (Spinosa *et al.*, 2017).

A mastite interfere diretamente na produção leiteira tanto em quantidade quanto em qualidade, determinando modificações na composição do leite. Estas alterações estão relacionadas ao grau de lesão e extensão do processo inflamatório, que é dependente da patogenicidade do agente etiológico. Em casos de infecções invasivas, persistentes e /ou múltiplas no tecido mamário, onde o tratamento durante a lactação não foi efetivo a TVS com antimicrobianos IMM e SIT, pode ser ineficiente, recomendando o uso de combinações sinérgicas com antibióticos sistêmicos (Ruegg, 2018).

2.3 TERAPIA COMBINADA PARA TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA NA SECAGEM

A terapia combinada é utilizada para tratamento de várias doenças infecciosas em rebanhos leiteiros. Existem poucos estudos que embasam esta prática para o tratamento da mastite bovina, apesar de ser uma prática bastante utilizada em fazendas leiteiras. Os objetivos da politerapia antimicrobiana, se baseiam em aumentar a rapidez e o espectro de ação das drogas, buscando como efeito desejado o sinergismo (Goodman *et al.*, 1996).

As associações entre antimicrobianos podem promover três respostas: antagonismo, sinergismo e efeito aditivo. O antagonismo é observado quando o efeito da combinação de antimicrobianos é significativamente inferior aos efeitos independentes de cada um deles. Os efeitos sinérgicos, são observados quando o efeito da associação é significativamente maior, do que, aquele de cada um isoladamente. Já o efeito aditivo ou indiferente, ocorre quando os efeitos da combinação de uma associação de antimicrobianos é igual à soma de suas atividades independentes (Spinosa *et al.*, 2017).

O uso dos antibióticos para tratamento da mastite, tem como objetivo, auxiliar o sistema imune, na eliminação de patógenos causadores da mastite. Para tratamento da mastite seja ela clínica ou subclínica, o antimicrobiano escolhido deve atingir o quarto mamário afetado e manter concentração inibitória mínima (CIM) no tecido por um período mínimo (Smith, 2010). Os antibióticos utilizados para tratamento da mastite, podem ser usados pela via sistêmica e/ou IMM. Pela via IMM, a droga consegue atingir altas concentrações no leite logo após a infusão. Por outro lado, os antimicrobianos administrados pela via IMM, não conseguem atingir regiões mais profundas do úbere tendo, baixa eficiência nos casos de infecções invasivas e/ou múltiplas no tecido mamário (Pyörälä, 2009).

Entretanto, os antimicrobianos utilizados pela via sistêmica, necessitam ter alta capacidade de difusão do sangue para a glândula mamária, além de atuar sobre debris inflamatórios e atingir CIM. A necessidade de lançar mãos de combinações sinérgicas entre antibióticos para a TVS parte da premissa de estudos norte-americanos, que estimaram uma proporção de quartos infectados no período seco na faixa de 8 – 25% para mastite clínica (Cook *et al.*, 2005) e 13 – 35 % para mastite subclínica (Pantoja *et al.*, 2009). Estes dados demonstram, que a TVS, está falhando em algum dos seus objetivos, na prevenção de novos casos de mastite ou na cura de infecções existentes. A partir destes dados, vários estudos têm avaliado diferentes medicamentos para se usar na TVS. No entanto, poucos estudos avaliaram a eficácia da associação sinérgica de antibióticos no momento da secagem para vacas com mastite subclínica.

O ceftiofur é uma cefalosporina de terceira geração pertencente a classe dos betalactâmicos, desempenhando função bactericida contra bactérias gram positivas e negativas (Roberson, 2012). Compreende um dos antimicrobianos mais utilizados para o tratamento e prevenção de mastite clínica e subclínica em vários países (Oliveira e Ruegg, 2014; Ruegg *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2019). Os antibióticos betalactâmicos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, por meio da inibição da síntese das transpeptidases que estão envolvidas na ligação cruzada do peptidoglicano, porém não são capazes de atuar na parede celular formada (Tavares, 2002). Além disso, caracterizam-se por ser pouco irritantes ao tecido mamário e possuir boa distribuição pela glândula mamária inflamada (Spinosa *et al.*, 2017). A condição essencial para ação bactericida destes antibióticos é que os microrganismos estejam se multiplicando (fase de crescimento logarítmico), quando então, há necessidade da síntese da parede celular (Meyer *et al.*, 1996). Geralmente os betalactâmicos são associados aos aminoglicosídeos para o tratamento de doenças infecciosas. A associação concomitante entre inibidores da síntese da parede celular bacteriana com a gentamicina, leva a aumento da penetração deste através da membrana celular bacteriana incompleta (Trabulsi e Soares, 2002).

A gentamicina compreende um antimicrobiano pertencente a classe dos aminoglicosídeos, os quais são antibióticos bactericidas por interferir na síntese proteica bacteriana ligando-se à subunidade 30 S do ribossomo. Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos ligam-se irreversivelmente à subunidade 30 S do ribossomo, deformando e alterando o funcionamento dessa organela, que passa a unir os aminoácidos que irão formar as proteínas de maneira errada. Com isso, formam-se proteínas anormais que, ao participarem de estruturas essenciais da célula, farão com que essas estruturas sejam defeituosas e sofram alterações lesivas à sobrevivência do germe. Com a formação de proteínas erradas, altera-se o funcionamento da membrana celular e provoca a saída de sódio, potássio, aminoácidos e outros constituintes essenciais da célula, resultando na morte do microrganismo (Riviere e Spoo, 2003). Atualmente, é comum empregar os aminoglicosídeos em dose única. Apesar da meia vida curta destes antibióticos, eles possuem efeito pós-antibiótico (supressão do crescimento bacteriano que se segue após a remoção do antimicrobiano). Esse uso evita a resistência bacteriana e também a nefrotoxicidade, uma vez que as células renais ficam expostas ao aminoglicosídeo por um período total de tempo menor, devido ao aumento do intervalo entre as doses (Tavares, 2002).

Os aminoglicosídeos em geral, não tem boa atuação em Ph ácido, como em inflamações purulentas. Por tal motivo, que cada vez menos se usa aminoglicosídeos para tratamento de mastite bovina pela via IMM, buscando usar estes pela via sistêmica. Pela via IMM, emprega-se antibióticos com boa distribuição em ph ácido, como o ceftiofur (Spinosa *et al.*, 2017). A penetração dos aminoglicosídeos na célula bacteriana é facilitada pela ação de inibidores da síntese da parede celular, como os antibióticos beta-lactâmicos e os glicopeptídeos. Isto explica o sinergismo de ação entre essas drogas, observado em seu uso combinado, além de desempenhar suas funções bactericidas por vias diferentes. A combinação de aminoglicosídeos com antibióticos beta-lactâmicos resulta em efeito sinérgico contra os germes sensíveis ou parcialmente sensíveis. Esse sinergismo é conhecido de longa data entre a penicilina G e a estreptomicina sendo observado com os diferentes aminoglicosídeos e as novas penicilinas (Chambers, 2001).

3 HIPÓTESES

A associação sinérgica entre antibiótico intramamário para vaca seca e sistêmico aumenta a taxa de cura celular e bacteriológica de vacas com quarto mamário com mastite subclínica na secagem.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da associação entre antibioticoterapia intramamária para vaca seca e antibioticoterapia sistêmica sobre a taxa de cura celular e bacteriológica de vacas com quarto mamário com mastite subclínica na secagem.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da associação entre antibioticoterapia intramamária para vaca seca e antibioticoterapia sistêmica sobre a CCS no pós-parto;

Avaliar o perfil microbiológico do leite, antes da secagem e no pós-parto em função da estratégia de TVS;

Avaliar a relação entre os graus de hiperqueratose com a CCS;

Avaliar a relação entre perda de escore de condição corporal com a CCS.

5 METODOLOGIA

O experimento foi realizado em quatro fazendas comerciais, sendo duas localizadas na região norte do Rio grande do Sul, nas coordenadas -28.647864, -52.427181 e -28.50308, -52.44299 e as outras na região Oeste de Santa Catarina nas coordenadas -27.116803,-53.794527 e -27.0122770,-51,3883840. Foram utilizadas 42 vacas das raças Holandês, Jersey e mestiças Holandês x Jersey com peso vivo médio de 580 ± 50 kg, dias em lactação médio no momento da secagem de 358 ± 84 e produção de leite na secagem de 21.5 ± 9 kg.

Uma das fazendas adota sistema de produção semiconfinado. As outras três fazendas adotam sistema de confinamento, sendo uma com sistema *free-stall*, uma com *compost barn* e outra com ambos os sistemas.

As vacas são ordenhadas três vezes ao dia, nas três fazendas que os animais são confinados e duas vezes ao dia na propriedade que os animais são mantidos em semiconfinamento.

As fazendas adotam rotina de ordenha similar, composta por descarte dos primeiros jatos, pré-dipping e secagem dos tetos com papel toalha, sendo usado um papel por teto. Todos os ordenhadores usam luva de látex durante a ordenha. Após o desacoplamento do conjunto de ordenha, os tetos são imersos numa solução desinfetante *pós-dipping* que cobre todo o teto.

Em duas fazendas que possuem as vacas confinadas e na fazenda a semiconfinada, após a secagem, as vacas foram movidas para um piquete com sombra, onde recebem uma dieta específica para vaca seca. Trinta dias antes da data prevista para o parto as vacas são movidas para dentro dos alojamentos e receberam dieta acidogênica. Em uma das fazendas com vacas confinadas as vacas permanecem durante todo seu período seco alojadas. No pós-parto, as vacas foram movidas diretamente para o lote de alta produção das fazendas, exceto em uma das propriedades que possui um lote de vacas recém-paridas, no qual permanecem nas primeiras 3 semanas de lactação.

No momento da secagem as vacas foram selecionadas obedecendo cinco critérios para participar do estudo: (1) ter pelo menos um quarto mamário com escore maior ou igual a uma cruz no *California Mastitis Test* (CMT) (Constable *et al.*, 2017), (2) não ter sinal clínico de enfermidades, (3) ter período seco previsto de no mínimo 40 dias e no

máximo 80 dias, (4) não estar com mastite clínica no momento da secagem e (5) não estar sob tratamento com antibióticos.

A partir do resultado obtido no CMT, do quarto mamário que apresentou escore mais alto, a partir de uma cruz, coletou-se amostras para análise de CCS e isolamento bacteriano. As vacas de cada rebanho foram blocadas de acordo com a ordem de parto e escore no CMT, sendo distribuídas aleatoriamente a um dos seguintes tratamentos: os animais do grupo controle $n= 31$ (IMM) receberam na secagem somente terapia IMM, com antibiótico vaca seca a base de cloridrato de ceftiofur 500 mg (Spectramast vaca seca, Pfizer saúde animal) e selante de tetos a base de subnitrato de bismuto 4 gramas (Teatseal, Zoetis). O grupo tratado $n= 31$ (IMM + parenteral), recebeu além da terapia vaca seca, a aplicação em dose única, pela via intra-muscular de 4.4 mg/Kg de sulfato de gentamicina (Pangram, Virbac). O método de secagem usado foi a secagem abrupta.

Na secagem e nos dias 7 ± 2 , 15 ± 2 e 25 ± 2 pós-parto foi realizado a coleta de leite para a análise de CCS e isolamento bacteriano. Os procedimentos para coleta de leite para CCS e isolamento bacteriano, obedeceram a seguinte ordem na secagem e no pós-parto: (1) descarte dos três primeiros jatos; (2) imersão dos tetos em solução desinfetante (pré-dipping), (3) secagem dos tetos com papel toalha, (4) desinfecção da ponta dos tetos com gaze embebida em álcool 70%; (5) coleta de leite para análise microbiológica e CCS, (6) ordenha, (7) administração dos protocolos de vaca seca e (8) pós-dipping. Para a análise de CCS foram coletadas amostras de leite do quarto mamário com reação mais forte a partir de uma cruz no CMT. Obedecendo a ordem descrita acima, imediatamente antes da ordenha da manhã, foi coletada uma amostra de 20 ml de leite, conforme descrito por Riekerink *et al.*, 2007. As amostras para análise de CCS foram acondicionadas em frascos contendo o conservante bactericida bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol), colocadas em caixa térmica a temperatura de 4 °C e enviadas a um Laboratório pertencente à Rede Brasileira de Qualidade do Leite (Serviço de análises de Rebanhos Leiteiros da Universidade de Passo Fundo - SARLE – UPF). No laboratório a CCS foi determinada por citometria de fluxo com o aparelho Somacount 300™ (Bentley Instruments Inc. Chasca, MN, USA).

Para o isolamento bacteriano uma amostra de 15 ml de leite do quarto mamário selecionado foi coletada em frascos plásticos estéreis, antes da ordenha da manhã. As amostras foram identificadas e acondicionadas em caixa térmica com gelo, mantidas numa temperatura de 4 – 5 °C, posteriormente congeladas a -20 °C e enviadas ao

laboratório para a análise microbiológica (Oliver et al. 2004). Os procedimentos microbiológicos utilizados para o diagnóstico de mastite seguem o Laboratory Handbook on Bovine Mastitis (Adkins, 2017) publicado pelo Conselho Nacional de Mastite dos EUA (National Mastitis Council). No laboratório as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente ou em banho-maria a $<37^{\circ}\text{C}$. Posteriormente 0,01 ml de leite será inoculado na placa de Ágar sangue. Após a inoculação das amostras as placas foram incubadas a 37°C . O diagnóstico microbiano foi realizado 48 horas após a incubação. As amostras que apresentaram crescimento de três ou mais tipos de colônias, foram consideradas contaminadas e descartadas.

Paralelamente as coletas de leite realizou-se a avaliação das condições da extremidade dos tetos em todas as vacas que foram incluídas no estudo. Foi avaliada a severidade da hiperqueratose, por meio de escore visual, utilizando-se escala de 1 a 4 (1- extremidade sem formação de anel; 2- extremidade com pequena formação de anel; 3- extremidade com formação de anel rugoso; 4- extremidade com bastante anel rugoso), de acordo com metodologia descrita por Mein *et al.*, (2001).

O escore de condição corporal (ECC) também foi avaliado. Quando as vacas eram colocadas na sala da espera, foi realizada a avaliação do ECC. Usou-se a escala de 1 – 5, sendo 1 vacas extremamente magras e 5 vacas extremamente gordas. A escala foi quebrada em 0.25 pontos, durante a avaliação (Edmondson *et al.*, 1989).

Para avaliar as condições de higiene das vacas se usou o escore de higiene de úbere (EHU). Visualmente se avaliou a limpeza do úbere e pernas das vacas alocadas no estudo. A pontuação usada variou de 1 – 4, sendo 1= ausência de esterco; 2= pequenos respingos de esterco 10% da área); 3= 10 – 30% das áreas com placas de esterco; 4= > 30% das áreas cobertas com esterco (Schreiner e Ruegg, 2003).

O escore de claudicação (EC) também foi avaliado. Após a ordenha, realizou-se a avaliação visual da locomoção dos animais, sendo que o EC, variou de 1 – 5. Escore 1: vaca normal - movimentação normal; escore 2: claudicação leve- postura arqueada ao andar, porem a marcha permanece normal; escore 3: claudicação moderada - postura arqueada tanto em estação quanto andando, marcha irregular com um ou mais membros afetados; escore 4: claudicação - postura arqueada e marcha com um passo de cada vez, favorecendo um ou mais membros; escore 5: claudicação severa - incapacidade ou relutância extrema para suportar o peso de um ou mais membros (Sprecher *et al.*, 1997).

As vacas que receberam terapia antimicrobiana para alguma doença durante o período seco ou no pós-parto, foram excluídas do estudo. Para avaliar a ocorrência de mastite clínica no período seco, observou-se diariamente a glândula mamária, a fim de detectar sinais de inflamação. Durante a lactação, a detecção de mastite clínica foi realizada mediante o teste da caneca de fundo preto, para detectar alterações visuais no leite. Para o diagnóstico de mastite subclínica realizou-se o CMT e a CCS.

Análises estatísticas

Para fins de análises, os dados de CCS foram transformados para escore de células somáticas (ECS) pela equação $[\text{Log}_2(\text{CCS}/100.000)] + 3$ (Shook e Schutz, 1994). Os dados das análises microbiológicas das amostras de leite foram agrupados quanto ao crescimento de patógenos como negativas (ausência de crescimento) e positivas (crescimento de algum agente).

A associação entre os tratamentos e o crescimento de patógenos no leite foi analisada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), utilizando-se o procedimento FREQ do pacote estatístico SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os dados de CCS foram submetidos à análise de variância como medidas repetidas no tempo, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS, sendo os dados previamente testados para a normalidade de resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a avaliação do escore de células somáticas em função dos tratamentos modelo estatístico incluiu os efeitos do tratamento ($i = \text{IMM}$ ou $\text{IMM} + \text{parenteral}$), da semana pós-parto ($j = 1, 2$ ou 3), da interação entre tratamento e semana e das covariáveis produção de leite no dia da secagem e ECS à secagem.

Para a avaliação do efeito da perda de condição corporal entre a secagem e o final do período experimental sobre o ECS pós-parto o modelo estatístico incluiu os efeitos do tratamento ($i = \text{IMM}$ ou $\text{IMM} + \text{parenteral}$), da semana pós-parto ($j = 1, 2$ ou 3), da perda de condição corporal como covariável e da interação entre o tratamento e a mudança de condição corporal.

Em todas as análises foi utilizado o nível de 5% de significância, considerando-se como tendência o nível de significância entre 5 e 10%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os grupos experimentais ocorreu a exclusão de animais devido a ocorrência de doenças clínicas. Dos 31 animais submetidos ao tratamento IMM, 24 chegaram ao final do trabalho (77.41%), havendo 7 exclusões (2 metrite, 1 tristeza parasitária bovina, 1 aborto, 1 luxação de patela, 1 cetose clínica e 1 mastite). No grupo tratado dos 31 animais colocados no estudo, 18 chegaram ao final do experimento (58.08%), tendo 13 exclusões (3 metrite, 3 tristeza parasitária bovina, 1 mastite, 2 deslocamento de abomaso à esquerda, 3 abortos e 1 pneumonia). Pode-se observar uma alta incidência de doenças da secagem até os primeiros 21 dias após o parto, com 22.59% e 41.95% dos animais acometidos por pelo menos uma doença no período experimental, tendo que deixar o estudo, para os tratamentos IMM e IMM + parenteral, respectivamente. O período de transição, é caracterizado pela alta incidência de doenças metabólicas e infecciosas (Ingvarsen *et al.*, 2003). Os resultados de doenças clínicas observadas no presente estudo, são muito semelhantes aos observados por Santos *et al.*, 2010, onde avaliou-se 5719 vacas em sete rebanhos diferentes nos EUA. Foi observado que 44% das vacas que participaram do estudo, foram acometidas por pelo menos uma doença, durante o período de transição. Em estudo conduzido em vacas a pasto no Brasil, Daros *et al.*, (2017), observaram uma incidência de doenças clínicas de aproximadamente 32%, nos rebanhos avaliados. Os dados da incidência de doenças clínicas no período de transição dos estudos americanos e brasileiros, ficam muito próximos dos resultados, encontrados no presente trabalho. Esta alta incidência de enfermidades ao redor do parto, é atribuído as alterações fisiológicas que acometem as vacas durante esse período. Depressão na ingestão de matéria seca (Hammon *et al.*, 2006), redução na concentração de IGF-I (Sander *et al.*, 2011), aumento dos AGL (Ster *et al.*, 2012) e baixa nos níveis séricos de cálcio (Martinez *et al.*, 2012) são as principais alterações no metabolismo dos animais, que afetam maleficamente a imunidade das vacas leiteiras durante o período de transição.

Estes efeitos deletérios das alterações metabólicas no periparto são corroborados pelo fato de que, quando foi incluído no modelo o efeito da mudança de condição corporal entre a secagem das vacas e a terceira semana pós-parto, esta variável afetou ($p= 0.0449$) a CCS nas primeiras semanas pós-parto ($ECS = 0.0449 - 1.8037 * \text{mudança de ECC}$), de modo que a maior perda de ECC está relacionada com aumento de ECS. Não houve

interação entre os efeitos da perda de ECC e dos tratamentos, indicando que este efeito independe do tratamento ao qual as vacas foram submetidas. Alguns trabalhos correlacionam a alta perda de peso no período de transição, com a maior ocorrência de doenças infecciosas. Isso foi visto por Chebel *et al.*, (2018), que observaram uma maior ocorrência de doenças uterinas, naquelas vacas que tiveram uma maior perda de ECC. Além disso, Leelahapongsathon *et al.*, (2016), demonstraram que as vacas com uma maior perda de ECC no pós-parto tiveram maiores taxas de IIMM. Segundo Valde *et al.*, (2007) rebanhos em que as vacas possuem uma alta perda de peso após o parto, possuem uma maior incidência de casos de mastite durante a lactação. Essa maior incidência de doenças infecciosas, destacando-se a mastite, em vacas que perdem excessiva condição corporal no pós-parto, está associada a redução da atividade da mieloperoxidase (Hammon *et al.*, 2006) e diminuição da atividade neutrofílica (Hammon *et al.*, 2006). Por isso, vacas com perda excessiva de peso, sendo esse em sua grande parte tecido adiposo, possuem comprometimento da destruição de microorganismos e isso, leva a aumento da incidência de doença infecciosas (Crookenden *et al.*, 2017).

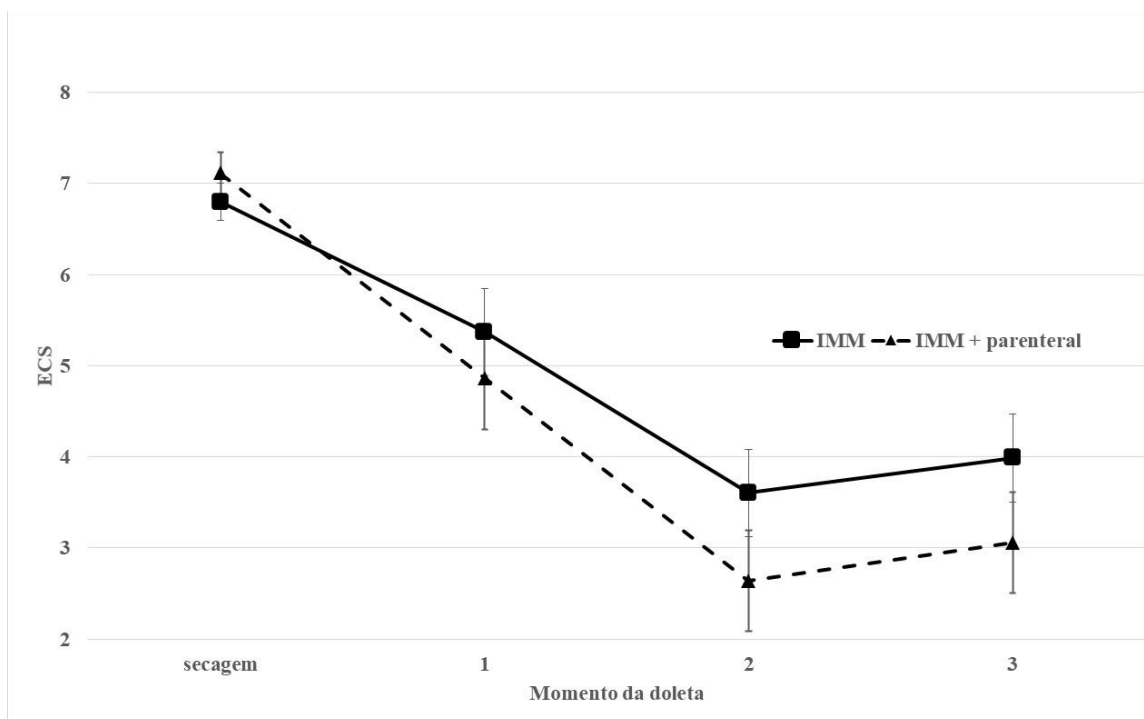
No momento da secagem, o escorre de células somáticas, a ordem de parto, a produção de leite, a taxa de crescimento microbiano, EPT, ECS, EC, ECC e o EHU, não se diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Nas três coletas pós-parto houve tendência ($p= 0.0676$) de menor ECS nas vacas submetidas a IMM + parenteral em relação às com IMM, com valores médios \pm erro padrão da média (EPM) de $4,32 \pm 0,28$ para o tratamento IMM e $3,52 \pm 0,32$ para o tratamento IMM + parenteral. Não houve interação entre tratamento e semana ($P=0,8881$). Na Figura 1 estes valores médios de ECS e seus respectivos EPM estão representados graficamente ao longo das semanas pós-parto.

Estes resultados demonstram que o grupo IMM + parenteral, teve uma baixa mais acentuada no ECS no pós-parto. Ismail *et al.* (2018) avaliaram duas associações antimicrobianas com antibióticos injetáveis e IMM, ou somente IMM, observando menor CCS durante os primeiros 100 DEL nos grupos com politerapia. Bolourchi *et al.*, (1995), compararam o efeito de associar tilosina parenteral com beta-lactâmicos e aminoglicosídeos pela via IMM. Demonstrou-se que a associação foi mais efetiva na taxa de cura de agentes contagiosos, em relação ao tratamento IMM somente, como foi visto no atual estudo. Conteras *et al.*, (2013), em um estudo de campo, alocou as vacas no momento da secagem em quatro grupos experimentais: macrolídeos sistêmicos

associados a beta-lactâmicos IMM com selante de tetos, somente beta-lactâmicos IMM com selante de tetos, macrolídeos sistêmicos com selantes de tetos e por fim, macrolídeos sistêmicos sem selantes de tetos. Foi observado uma maior taxa de cura para agentes Gram + naqueles animais que receberam na secagem o antibiótico IMM com selante de tetos e parenteral, contribuindo para um ECS menor nas coletas de pós-parto para esse grupo. Soback *et al.*, 1990, também obteve menor incidência de patógenos isolados no pós-parto, naquelas vacas que receberam antibióticos sistêmicos. Estes dados, corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, onde foi visto, uma maior taxa de cura para agentes contagiosos, no grupo IMM + Parenteral, contribuindo para um declínio no ECS, nas coletas do pós-parto. Além disso, outro dado que colaborou com os obtidos no presente trabalho, foi a diminuição do ECS, nas coletas de pós-parto, em todos os grupos, independente da TVS empregada. Resultados semelhantes foram obtidos por Pantoja *et al.*, (2009), onde realizou-se a TVS em ambos os grupos experimentais e comparou a CCS no pós-parto inicial e no primeiro controle leiteiro. A média de CCS nas duas coletas no pós-parto, foi menor em relação, a coleta na secagem. Por outro lado, Erskine *et al.*, (1994) associou hidrocloreto de oxitetraciclina sistemicamente com cefapirina benzatina pela via IMM. Não foi observado, boa eficácia do tratamento, contra agentes contagiosos. Em contrapartida Musal e Izgür, (2006), compararam o efeito de uma associação sinérgica entre beta-lactâmicos IMM e quinolonas via sistêmica. Foi observado, aumento significativo na taxa de cura para agentes contagiosos para o grupo tratado com antibióticos pela via sistêmica e IMM. Portanto, a eficácia da politerapia depende da associação utilizada. A TVS combinada, pode ficar comprometida em alguns casos, devido a combinações antimicrobianas antagônicas, pela pobre difusão das drogas na glândula mamária inflamada, baixa difusão do antimicrobiano do sangue para o tecido inflamado e incapacidade de manter uma CIM no local da infecção (Ziv *et al.*, 1980). Em vários estudos a combinação de antibióticos sistêmicos com IMM, tiveram efeito no ECS, taxa de cura bacteriana e prevenção de novas infecções. No atual, trabalho foi evidenciado uma menor ECS e redução de crescimento microbiano nas vacas que receberam a terapia combinada no momento da secagem.

Figura 1. Valores médios \pm erro padrão da média (EPM) da ECS para os tratamentos nos momentos de coleta de amostra. Os valores médios no momento da secagem correspondem à covariável.



Na tabela 1, pode ser observado, a porcentagem de animais positivos e negativos para crescimento de algum tipo de bactéria, de acordo com o tratamento. A porcentagem de amostras positivas e negativas não se diferiu entre os grupos experimentais, na secagem, primeira semana e terceira semana de pós-parto. No momento da secagem o grupo controle teve 50% de cultura negativa e o grupo tratado 61.15%.

Tabela 1. Porcentagem de animais positivos para crescimento de bacteriano, nos diferentes períodos do estudo.

| Momento | % Positivos | | Valor de P (χ^2) |
|----------|-------------|------------------|-------------------------|
| | IMM | IMM + parenteral | |
| Secagem | 50,0 | 38,9 | 0,4740 |
| Semana 1 | 25,0 | 5,6 | 0,0943 |
| Semana 2 | 33,3 | 5,6 | 0,0299 |
| Semana 3 | 33,3 | 16,7 | 0,2241 |

A alta frequência de resultados negativos observados no presente estudo, colaboram com os dados observados por Tomazi *et al.*, (2018), onde 44% das amostras observadas, apresentou ausência de crescimento bacteriano. Essa alta incidência de amostras com ausência de crescimento microbiano é observada também em estudos com mastite clínica. El Sayed *et al.*, (2017), obteve crescimento variando entre 60 – 70% das amostras coletadas de vacas com mastite clínica. A maior porcentagem de vacas com crescimento negativo no presente estudo, pode ser atribuído ao fato, que foi coletado leite de vacas com mastite subclínica. Além disso, estes animais podem apresentar alta reação no CMT e conseqüentemente alta CCS, porém com ausência de IIMM. A presença de uma elevada CCS no momento da secagem, com isolamento bacteriano negativo, pode ter relação com a presença de células epiteliais da glândula mamária, já que a maioria das vacas tinha DEL acima de 300 dias (Murphy *et al.*, 2016). Em infecções contagiosas de origem crônica, pode haver resultados negativos, em razões da persistência da infecção crônica, que reduz a contagem de bactérias viáveis na amostra, levando a resultados falso-negativos. Já em infecções de origem ambiental, o sistema imune é capaz de eliminar 75 a 85% dos agentes causadores de mastite (Ruegg, 2018). A porcentagem de amostras positivas na segunda semana, foi significativamente menor para o grupo tratado em relação ao grupo controle, como pode ser observado na tabela 1. Na segunda semana após o parto as vacas do grupo IMM + parenteral, apresentaram uma maior porcentagem de cura bacteriológica, em relação aos animais do grupo controle. Isso demonstra um benefício, do uso da associação antimicrobiana em termos de cura microbiológica de mastite subclínica, quando comparado ao grupo IMM. O benefício de usar terapia associativa parece ter melhores resultados em casos de IIMM invasivas, múltiplas e crônicas onde o tratamento no quarto mamário somente, pode não ser suficiente, pois a droga não consegue atingir regiões profundas do úbere (Pyörälä, 2009). Nestes casos, recomenda-se a politerapia. Outros estudos demonstram um aumento na taxa de cura para a TVS combinada ao redor de 25%, quando comparado a TVS IMM somente (Owen *et al.*, 1997). Além disso, outros trabalhos que compararam a eficácia da terapia IMM com o tratamento combinado, observou benefício na taxa de cura de mastite causada por agentes contagiosos (Steenefeld *et al.*, 2011). Segundo Ismail *et al.*, (2018), o uso de associações sinérgicas entre antibióticos reduz os casos de mastite aguda e crônica nos primeiros 100 dias de lactação, além de diminuir a taxa de descarte involuntário durante o período seco e primeiros 100 dias em lactação.

Na tabela 2, pode-se observar os agentes isolados por grupo experimental desde a secagem, até a última coleta no pós-parto. Pode-se observar que a porcentagem de isolamento positivo foi similar entre os tratamentos no momento da secagem. No entanto, observa-se uma menor identificação de agentes nas duas primeiras semanas pós-parto para o grupo IMM + parenteral.

Tabela 2. Número de vacas por agente isolado no momento da secagem e nas três coletas após o parto.

| Agente | Secagem | | Semana 1 | | Semana 2 | | Semana 3 | |
|------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Controle | Tratado | Controle | Tratado | Controle | Tratado | Controle | Tratado |
| Negativo | 12 | 11 | 18 | 17 | 16 | 17 | 16 | 15 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| SCN | 8 | 3 | 4 | 1 | 7 | 0 | 6 | 3 |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

Não foi observado efeito do EHU e do EC sobre o ECS ($P > 0,05$).

O EPT afetou o ECS ($p= 0.036$), não havendo interação entre semana e EPT. Quanto maior o grau de hiperqueratose, maior foi o ECS. Foi observado, que as vacas com EPT 4 apresentaram ECS maior em relação a vacas com EPT 1 ou 2, independente das semanas (Tabela 3). Os resultados obtidos no presente estudo, corroboram com os achados de Mulei (1999) e Cardozo *et al.*, (2015), que observaram correlação positiva entre altos EPT e prevalência de mastite subclínica. O presente estudo, encontrou uma relação mais acentuada entre EPT 4 com aumento de ECS. Isso colabora com os resultados observados por Asadpour *et al.* (2015), os quais não observaram aumento da predisposição a IIMM em vacas com EPT 2 e 3. Pantoja *et al.*, (2020) observaram em sua revisão bibliográfica, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. As vacas com hiperqueratose severa possuem uma predisposição maior a desenvolver IIMM tanto por patógenos ambientais, quanto contagiosos. Parece, que vacas com EPT intermédios não possuem relação importante com CCS elevada e incidência de mastite clínica.

Tabela 3 - Média dos quadrados-mínimos \pm erro-padrão da média do Escore de Células Somáticas (ECS) em função do Escore de ponta de tetos (EPT)*

| EPT | ECS |
|-----|------------------------|
| 1 | 3,6792 \pm 0,3188 b |
| 2 | 3,6875 \pm 0,3304 b |
| 3 | 4,3885 \pm 0,7241 ab |
| 4 | 6,2723 \pm 0,6506 a |

*médias seguidas de letras diferentes diferem pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$)

7 CONCLUSÃO

Vacas com mastite subclínica na secagem submetidas a associação entre antibiótico IMM com sistêmico tendem a apresentar menor ECS e redução de crescimento bacteriano no pós-parto. Mais estudos são necessários para confirmar este efeito. A perda de condição corporal entre a secagem e as primeiras semanas pós-parto, assim como quadros de hiperqueratose severa, provocam aumento do ECS no pós parto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, P.R.F. **Laboratory handbook on bovine mastites.** In (National Mastitis Council, 2017).

ALERI, J. W. et al. **Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period.** Res. Vet. Sci. 108, 8-17, 2016.

ASADPOUR, R.; BAGHERNIAEE, H.; HOUSHMANDZAD, M.; et al. **Relationship between teat end hyperkeratosis with intra mammary infection and somatic cell counts in lactating dairy cattle.** Revue De Medecine Veterinaire, v. 166, n. 9–10, p. 266–270, 2015.

BAR, D. L. W., TAUER. G., BENNETT, R. N., GONZALEZ, J. A., HERTL, Y. H., SCHUKKEN, H. F., SCHULTE, F. L., WELCOME,. Y. T., GROHN. **The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming.** J. Dairy Sci. 91:2205–2214, 2008.

BIRTEN, E. M. R. E.; ALAÇAM, E. **The Occurrence of Teat Hyperkeratosis in Cows and Its Effect on Milk Somatic Cell.** Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences, v. 6, n. 1, p.1–6, 2015.

BODDIE, R. L. E S. C. NICKERSON. **Dry cow therapy: Effects of method of drug administration on occurrence of intramammary infection.** J. Dairy Sci. 69:253-257, 1986.

BOLOURCHI M, HOVARESHTI P, TABATABAYI AH. **Comparison of the effects of local and systemic dry cow therapy for staphylococcal mastitis control.** Prev Vet Med ; 25(1):63-67, 1995.

BRADLEY, A. J. & GREEN, M. J. **The importance of nonlactating period in the epidemiology of intrmammary infection and strategies for prevention.** Vet clin North Am Food anim Pr. 20. 547-568, 2004.

BRADLEY, A. J., AND M. J. GREEN. **A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period.** J. Dairy Sci. 83:1957–1965, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2019. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/vbp-e-estimado-em-r-689-97-bilhoes-para-2020/202003VBPelaspeyresagropecuariapdf.pdf> >. Acesso em: 15 jun. 2021.

BRUCKMAIER, R. M. & GROSS, J.J. **Lactational challenges in transition dairy cows.** Anim.Prod. Sci. 57, 1471 – 1481, 2017.

CARDOZO, L. L.; THALER NETO, A.; SOUZA, G. N.; ET AL. **Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil.** Journal of dairy science, v. 98, n. 11, p. 7675–85, 2015.

CHAMBERS H. F. **The aminoglycosides.** In: **Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics.** 10.ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

CHEBEL R.C. MENDONÇA L.G.D. BARUSELLI P.S. **Association between body condition score change during the dry period and postpartum health and performance.** J. Dairy Sci. 101 (29550131): 4595-4614, 2018.

CHURCH, G. T., L. K. FOX, C. T. GASKINS, D. D. HANCOCK, AND J. M. GAY. **The effect of a shortened dry period on intramammary infections during the subsequent lactation.** J. Dairy Sci. 91:4219-4225, 2008.

COOK, N. B., D. PIONEK, AND P. SHARP. **An assessment of the benefits of Orbeseal when used in combination with dry cow antibiotic therapy in three commercial dairy herds.** Bovine Pract. 39:83-94, 2005.

CONTRERAS B, G. A., GUTERBOCK, W., MUÑOZ R, J., & SEARS, P. M. **Comparison of systemic and intramammary dry cow treatments.** Revista MVZ Córdoba, 18(1), 3259-3264, 2013.

CONSTABLE, P .D., HINCHCLIFF, K.W., DONE, S. H., GRUNBERG, W. **Veterinary Medicine: A testbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** Veterinary medicine Elsevier, 2017.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. **Mastite bovina : Controle e Prevenção.** [S.l: s.n.], 2012.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; GARINO Jr., F. **Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina.** In: Congresso brasileiro de medicina veterinária, 28., 2001, Salvador, Anais .Salvador: Soc.Bras.Med.Vet., 2001. p.159.

DAROS RR, HÖTZEL MJ, BRAN JA, LEBLANC SJ, VON KEYSERLINGK MAG. **Prevalence and risk factors for transition period diseases in grazing dairy cows in Brazil.** Prev Vet Med. 2017 Sep 15;145:16-22. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.06.004, 2017.

EDMONDSON, A. J., I. J. LEAN, L. D. WEAVER, T. FARVER, AND G. WEBSTER. **A body condition scoring chart for Holstein dairy cows.** J. Dairy Sci. 72:68–78, 1989.

ERSKINE RJ, BARTLETT PC, CRAWSHAW PC, GOMBAS DM. **Efficacy of Intramuscular Oxytetracycline as a Dry Cow Treatment for Staphylococcus aureus Mastitis.** J Dairy Sci; 77(11):3347-3353, 1994.

GLEESON, D. E.; MEANEY, W. J.; O'CALLAGHAN, E. J.; RATH, M. V. **Effect of teat hyperkeratosis on somatic cell counts of dairy cows.** International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, v. 2, p. 115–122, 2004.

GOLÇALVES, J. L. CUE, R.I. LIMA NETTO, E.P. GAMEIRO, A. H. SANTOS, M. V. **Impacto da mastite subclínica sobre o desempenho econômico de rebanhos leiteiros.** Congresso brasileiro de qualidade do leite, pág. 305, 2019.

GOLDER, H. M.; HODGE, A.; LEAN, I. J. **Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 9, p. 7370-7380. ISSN 0022-0302, 2016.

GOMEZ, A. & COOK, N. B. **Time budgets of lactating dairy cattle in comercial freestall herds.** J. Dairy Sci. 936, 5772 – 5781 2010.

GOODMAN, A .G. GILMAN, L. C. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 7^a edition McGraw-Hill, 1996.

GOTT, P.N. RAJALA-SHULTZ, P.J. SCHUENEMANN, G.M. PROUDFOOT, K.L. HOGAN, J.S. **Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation.** J. Dairy Sci. 100:2080–2089. 2016.

GREEN, M. J., L. E. GREEN, G. F. MEDLEY, Y. H. SCHUKKEN, AND A. J. BRADLEY. **Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows.** J. Dairy Sci.85:2589-2599, 2002.

GREEN, M. J., A. J. BRADLEY, G. F. MEDLEY, AND W. J. BROWNE. **Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving.** J. Dairy Sci. 90:3764-3776, 2007.

HAGNESTAM-NIELSEN, C., & OSTERGAARD, S. **Economic impact of clincial mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses.** Animal , 3 (2), 315-328, 2009.

HAMMON D.S. EVJEN I.M. DHIMAN T.R. GOFF J.P. WALTERS J.L. **Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.** Vet. Immunol. Immunopathol. 113 (16740320): 21-29, 2006.

HALASA, T., K. HUIJPS, O. OSTERAS, AND H. HOGEVEEN. **Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review.** Vet.Q. 29:18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007>.

HILLERTON, E. & BOOTH, J. **The five-point Mastitis control plana-a. Revisory tutorial! In National Mastitis council annual meeting.** 3-19 Natl. Mastitis coun. Washington, DC, 2018.

HOGEVEEN, H. HUIJPS, K. LAM, T. J. G. M. **Economic aspects of mastites: new developments.** N. Z. Vet. J. 59, 16-23, 2011.

HUIJPS, K. LAM, T. J. G. M. HOGEVEN, H. **Costs of mastitis facts and perception.** J.Dairy Res. 75, 113 – 120, 2008.

INGVARTSEN, K., R.. DEWHURST, AND N.. FRIGGENS. **On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle?** A position paper. Livest. Prod. Sci. 83:277–308. doi:10.1016/S0301-6226(03)00110-6, 2003.

INGVARTSEN, K. L. & MOYES, K. **Nutrition, immune function and health of dairy cattle.** *Animal* 7, 112-122, 2013.

ISMAIL ZB, MUHAFFEL MM, ABU-BASHA E. **The effect of dry cow therapy using systemic tylosin in combination with common intramammary medications on mastitis rate, cull rate, somatic cell count, and milk production in dairy cows affected with subclinical mastitis.** *Veterinary World*, 11(9): 1266-1271, 2018.

JOHNSON, S. D. **Observations on the treatment of mastitis with acriflavine.** *Cornell Vet.*, 31:127, 1941.

JONES, G. M. **Proper Dry Cow Management Critical for Mastitis Control.** Virginia Cooperative Extension, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA. pp. 404-212, 2009.

KABERA, F. ET AL. **An observational cohort study on persistency of internal teat sealant residues in milk after calving in dairy cows.** *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 7, p. 6399- 6412. ISSN 0022-0302, 2018.

KROMBER, V. LEIMBACH, S. **Mastitis treatment – Reduction in antibiotic usage in dairy cows.** *Reprod. Domest. Anim.* 52, 21 - 29, 2017.

LEELAHAPONGSATHON, K. Piroon, T. Chaisri, W. Suriyasathaporn, W. **Factors in Dry Period Associated with Intramammary Infection and Subsequent Clinical Mastitis in Early Postpartum Cows.** *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29:580-585, 2016.

MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. **Prepartum application of internal teat sealant or intramammary amoxicillin on dairy heifers: Effect on udder health, survival, and performance.** *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 2, p. 1388-1402. ISSN 0022-0302, 2018.

MARTINEZ, N., F. S. LIMA, R. S. BISINOTTO, L. F. GRECO, E. S. RIBEIRO, F. MAUNSELL, K. N. GALVÃO, C. A. RISCO, AND J. E. P. SANTOS. **Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease.** *J. Dairy Sci.* 95:7158–7172, 2012.

MARTINS, C. M. M. R. ALVES, B. G. MONTEIRO, C. P. SANTOS, M. V. **Efficacy of a drying-off protocol using ciprofloxacin combined with an internal teat sealant.** In 56 th NMC Annual Meeting Proceedings 175 – 176, 2017.

MCDUGALL, S. **Management factors associated with the incidence of clinical mastitis over the non-lactation period and bulk tank somatic cell count during the subsequent lactation.** *NZ Vet. J.* 51:63-72, 2003.

MEIN, G.A., F. NEIJENHUIS, W.F. MORGAN, D.J. REINEMANN, J.E. HILLERTON, J.R. BAINES, I. OHNSTAD, M.D. RASMUSSEN, L. TIMMS, J.S. BRITT, R. FARNSWORTH, N. COOK AND T. HEMLING. **Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors.** Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality, NMC/AABP, Vancouver, p344-351, 2001.

MEYER, J. L.; BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**, 3ªed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1996.

MOLINA, L. R. ET AL. **Efficacy of an internal teat seal associated with a dry cow intramammary antibiotic for prevention of intramammary infections in dairy cows during the dry and early lactation periods**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, p. 465-470. ISSN 0100-736X, 2017.

MUSAL, B , İZGÜR, İ . **The efficacy of intramammary, systemic and combined antibiotics administered during dry off in cows with subclinical mastitis**. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 53: 175-178, 2006.

MURPHY, S. C., MARTIN, N. H., BARBANO, D. M. & WIEDMANN, M. **Influence of raw milk quality on processed dairy products; how do raw milk quality test results relate to product quality and yield?** J. Dairy sci 99, 10128-10149, 2016.

MULEI, C. **Teat lesions and their relationship to intramammary infections on small-scale dairy farms in Kiambu district in Kenya**. Journal of the South African Veterinary Association, v. 70, n. April, p. 156–157, 1999.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Recommended mastitis control program**. Disponível em: <<https://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf> >. Acesso em: julho de 2021.

NATZKE RP, EVERETT RW, BRAY DR. **Effect of drying off practices on mastitis infection**. J Dairy Sci 58:1828–1835, 1975.

NATZKE RP. **Elements of mastitis control**. J Dairy Sci; 64:1431-1442, 1981.

NEAVE, F. K., F. H. DODD, R. G. KINGWILL, AND D. R. WESTGARTH. **Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management**. J. Dairy Sci. 52:696-707, 1969.

NEIJENHUIS, F.; KONING, K.; BARKEMA, H. W.; HOGVEEN, H. **The effects of machine milking on teat condition**. In: A. Rosati; S. Mihina; C. Mosconi (Eds.); Physiological and Technical Aspects of Machine Milking. Rome, Italy: Icar Technical Series No. 7. Anais.... v. 7,p.33–40, 2001.

NEIJENHUIS, F.; BARKEMA, H. W.; HOGVEEN, H.; NOORDHUIZEN, J. P. **Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows**. Journal of Dairy Science, v.83, n. 12, p. 2795–804, 2000.

NEMET-NEJAT, K. R. 1998. **Daily Life in Ancient Mesopotamia**. Greenwood Press, Westport, CT.

NEWMAN, K. A., RAJALA-SCHULTZ, P. J., DEGRAVES, F. J. & LAKRITZ, J. **Association of milk yield and infection status at dry-off with intramammary infections at subsequent calving**. J. Dairy Res. 77, 99 – 106 (2010).

OLIVEIRA, L., AND P. L. RUEGG. 2014. **Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin**. J. Dairy Sci. 97:5426–5436, 2014.

OLIVER SP, GILLESPIE BE, HEADRICK SJ, MOOREHEAD H, LUNN P, DOWLEN HH, JOHNSON DL, LAMAR KC, CHESTER ST, MOSELEY WM. **Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows.** J Dairy Sci. 2393-400, 2004.

OWENS, W. E., RAY, C. H., BODDIE, R. L. & NICKERSON, S. C. **Efficacy of sequential intramammary antibiotic treatment against chronic s. aureus intramammary infection.** Large anim. Pract, 1997.

PANTOJA, J. C. F., C. HULLAND, AND P. L. RUEGG. **Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period.** Prev. Vet. Med. 90:43–54, 2009.

PANTOJA, J. C.F. et al. **Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review.** Journal of Dairy Science, v. 103, n. 2, p. 1843-1855, 2020.

PICOLI, T.; ZANI, J. L.; SILVA BANDEIRA, F. DA. **Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru.** Semina: Ciências Agrárias, v. 35, n. 4, p. 2471–2480, 2014.

PINEDO PJ, FLEMING C, RISCO CA. **Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies.** J Dairy Sci 95:7015–7026, 2012.

PINEDO, P. RISCO, C. MELENDEZ, P. **A retrospective study on the association between different dry period lengths and somatic cell counts, milk yield, reproductive performance, and culling in Chilean dairy cows.** J. Dairy Sci., 94, pp. 106-115, 2011.

PYÖRÄLÄ, S. **Treatment of mastitis during lactation.** Ir. Vet. J 62, S-40, 2009.

RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. **The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 11, p. 6915-6931. ISSN0022-0302, 2013.

RAJALA-SCHULTZ PJ, HOGAN JS, SMITH KL. **Short communication: association between milk yield at dry-off and probability of intramammary infections at calving.** J Dairy Sci. Feb;88(2):577-9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72720-X. PMID: 15653523, 2005.

RAJALA-SHULTZ, P.J. SCHUENEMANN, G.M. PROUDFOOT, K.L. GOTT, P.N. et al. **Effect of milk cessation method at dry-off on behavioral activity of dairy cows.** Journal of Dairy Science. 101:3261–3270, 2018.

RIEKERINK, R. G, BARKEMA, H. W. VEENSTRA, W. BERG, F. E. STRYHN, H. ZADOKS, R. N. **Somatic cell count during and between milkings.** J Dairy Sci. 90(8):3733-41, 2007.

RIVIERE J. C, SPOO J. W. **Antibióticos aminoglicosídeos.** In: Adams HR. **Farmacologia e terapêutica em veterinária.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROBERSON, J. R. **Treatment of clinical mastitis.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 28:271–288, 2012.

ROBERT, A., H. SEEGER, AND N. BAREILLE. **Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows—A quantitative analysis of published data.** Vet. Res. 37:25–48, 2006.

ROLLIN, K.C. E.; DHUYVETTERB, M.W. **Overton the cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: an economic modeling tool.** Preventive Veterinary Medicine, v.122,3, p.257-264, 2015.

RUEGG, P. L. **In dairy production medicine.** (eds. Carlos A. Risco. Retamal, P. M.) 207-232 (John Wiley, Sons), 2011.

RUEGG, P. L. **Making antibiotic treatment decision for clinical mastitis.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 34, 413-425, 2018.

RUEGG, P. L., L. OLIVEIRA, W. JIN, AND O. OKWUMABUA. **Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in Gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows.** J. Dairy Sci. 98:4521–4534, 2015.

Santos *et al.* **Reprod. 7 Dom. Rum.** VII:387-404, 2010.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L. F L. **Controle da mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções.** Pirassununga, 2019.

SANDER A.K. PIECHOTTA M. SCHLAMBERGER G. BOLLWEIN H. KASKE M. SIPKA A. SCHUBERTH H.J. **Ex vivo phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period.** J. Dairy Sci.; 94 (21426965): 1762-1771, 2011.

STEENEVELD, W., VAN WERVEN, T., BARKEMA, H. W. & HOGVEEN, H. **Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach.** J. Dairy Sci. 94, 174 -188, 2011.

SHOOK, G. E.; SCHUTZ, M. M. **Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States.** Journal of Dairy Science, v. 77, p. 648-658, 1994.

SPRECHER, D. J., D. E. HOSTETLER, AND J. B. KANEENE. **A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance.** Theriogenology 47:1179–1187, 1997.

SCHREINER, D. A., AND P. L. RUEGG. **Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis.** J. Dairy Sci. 86:3460–3465, 2003.

SCHEPERS, A.J. T.J. LAM, Y.H. SCHUKKEN, J.B. WILMINK, W.J. HANEKAMP. **Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters.** J. Dairy Sci., 80 (1997), pp. 1833-18409276824.

SEEGERS H, FOURICHON C & BEAUDEAU F. **Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds.** Veterinary Research, 34:475-491, 2003.

SMITH, .G. W. **Pharmacologic aspects of mastitis treatment.** In NMC Annual Meeting Proceedings, 2010.

SPINOSA, H. S. GÓRNIAC, S. L. BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SOBACK S, ADLER B, VAN DAMM B, WINKLER M, ZIV G & SARAN A. **Systemic dry cow therapy in control of subclinical Staphylococcus aureus infections.** In Proceedings of the National Mastitis Council, Indianapolis, IA, USA, pp. 134–138, 1990.

SOUZA, R.; SANTOS, G. T.; VALLOTO, A. A. **Produção e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em função da estação do ano e ordem de parto.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 11, n. 2, p. 484–495, 2008.

STER C. LOISELLE M.C. LACASSE P. **Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells.** J. Dairy Sci.; 95: 708-717, 2012.

SURIYASATHAPORN, W., C. HEUER, E.N. NOORDHUIZEN-STASSEN AND Y.H. SCHUKKEN. **Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review.** Vet. Res. 31:397-412, 2000.

TAVARES W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos.** 3.ed. São Paulo: Atheneu; 2002.

TRABULSI L. R, SOARES L. A. **Antibióticos aminoglicosídeos.** In: Silva P. Farmacologia. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

TOMAZI, T. *et al.* **Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastites in 20 Brazilian dairy herds.** Prev. Vet. Med. 161, 9 -18, 2018.

ZIV G. **Drug selection and use in mastitis: Systemic versus local therapy.** Journal of the American Veterinary Medical Association 176:1109–1115, 1980.