GUSTAVO FREU

**Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a
saúde do úbere**

Pirassununga

2019

GUSTAVO FREU

Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a saúde do úbere

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3848
FMVZ

Freu, Gustavo

Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a saúde do úbere / Gustavo Freu. – 2019.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Cura bacteriológica. 2. Novas infecções intramamárias. 3. Período seco. 4. Risco de mastite clínica. 5. Subnitrato de bismuto. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficácia do selante intramamário aplicado no momento de secagem de vacas leiteiras para sanidade do úbere", protocolada sob o CEUA nº 4827260117 (10.003595), sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos e equipe; Camylla Pedrosa Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 10/05/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the efficacy of the intramammary sealant applied at the time of drying of dairy cows for udder sanity", utilizing 750 Bovines (750 females), protocol number CEUA 4827260117 (10.003595), under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos and team; Camylla Pedrosa Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/10/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **12/2017**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **24 a 60 meses**

N: **750**

Linagem: **Holandesa/Girolando**

Peso: **350 a 700 kg**

Local do experimento: Será realizado em duas fazendas comerciais

São Paulo, 25 de março de 2019

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FREU, Gustavo

Título: Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a saúde do úbere

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação à minha família, em especial aos meus
pais Ocimar Freu e Maria Elisa Freu
Que apesar da distância, nunca me deixaram faltar
amor e carinho...*

*Dedico também à minha namorada Larissa
Quem durante este período dividiu comigo os momentos de
dificuldade e também os
momentos de triunfo...*

Sem vocês nenhum dos meus êxitos seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por me dar discernimento e força durante todas as etapas deste estudo. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer. Agradeço também pelas vacas, obras de sua criação e que se tornaram uma paixão pra mim e fruto de meu trabalho.

À minha família, que apesar da distância, jamais me deixaram faltar amor, carinho, companheirismo e confiança. Vocês souberam entender minhas ausências, souberam compreender e me apoiar durante os momentos de dificuldade, mas também vibraram comigo todas as minhas conquistas. Obrigado mãe, pai e irmão por cada palavra de incentivo e apoio, amo vocês!

À minha namorada Larissa, a joia que a vida me presenteou, a quem admiro e sou muito grato. Obrigado por suportar e ser paciente durante os momentos de angústia e tristeza. Tua companhia, teu abraço, teu amor e palavras de carinho amenizaram a dor e abrilhantaram meus dias.

Ao meu orientador Prof. Marcos Veiga dos Santos, pela confiança, por todas as oportunidades e pela orientação. O senhor é um grande incentivador e responsável pelo meu crescimento pessoal e profissional. Sem dúvidas contribuíste muito para que mais um de meus êxitos (a finalização desta dissertação) fosse possível.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de financiamento 001) pelo apoio financeiro durante o período de mestrado e à MSD Saúde Animal pelo fornecimento dos produtos utilizados neste estudo.

Aos professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal que contribuíram com minha capacitação profissional: Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, Augusto Hauber

Gameiro, Cesar Augusto Pospissil Garbossa, Francisco Palma Rennó, Júlio César de C. Balieiro, Márcio Antonio Brunetto, Paulo Henrique Mazza Rodrigues e Ricardo Ventura.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal: Alessandra, Fábila, Dona Lúcia, Dona Lurdes e João Paulo. Às meninas da limpeza: Dona Edna, Cecília e Dona Meire, e aos responsáveis pela segurança: Adriano e Luciano, que trabalham dia-após-dia para garantir o funcionamento do departamento. E principalmente, por nunca mediram esforços para auxiliar no que foi preciso e pelos momentos de descontração durante estes quase três anos de convívio.

Ao Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (QUALILEITE), que por muitas vezes foi minha segunda casa, onde pude aperfeiçoar meus conhecimentos e aprender novas tecnologias. Levo com muito carinho os momentos e as lembranças maravilhosas desse lugar.

À todos os colegas e amigos que passaram ou ainda estão no laboratório Qualileite e que tive o privilégio de conviver e aprender diariamente: Alessandra Módena Orsi, Bruna Gomes Alves, Brunna Granja, Breno Luis Garcia, Camylla Predrosa Monteiro, Carlos Eduardo Fidelis, Cristian Martins, Danielle Fonseca, Eduardo Pinheiro, Juliana Barreiro, Juliano Leonel Gonçalves, Larissa Martins, Lorena de Nicolo e Silva, Marcos Arcari, Melina Melo Barcelos, Renata de Freitas Leite e Tiago Tomazi. Você tornaram meus dias mais leves e alegres. Obrigado pelas festas, pelas boas risadas e por fazerem cada momento valer a pena!

Aos estagiários e alunos de prática profissionalizante, em especial à Letícia Martins Fernandes, por toda ajuda durante a fase experimental e de tabulação de dados. Obrigado por renunciarem de momentos de lazer para trabalhar. Na companhia de vocês vivenciei histórias inesquecíveis.

Ao João Forti, Vinicius Rolim, André Felipe Cavalli, Felipe Zanforlin, Laura Soares e Luis Fernando Faria Coury pelos inúmeros quilômetros rodados para auxiliar nas coletas de amostras de leite e pela paciência e comprometimento. Obrigado!

Agradeço aos especialistas do Laboratório Qualileite José Garcia Moreno e Lucinéia Mestieri. Por me acolherem em Pirassununga e pelas dicas durante minha fase de adaptação

nesta cidade. Vocês são pessoas maravilhosas que tive o prazer de conviver e que sempre acreditaram em mim.

Agradeço à Ana Carolina Campos e ao Tiago Tomazi por terem nos acolhido em Pirassununga como se fôssemos da família. Pessoas com um coração tão puro que nos ensinaram que não é preciso estar em nossos lares para sentir-se abraçado. A amizade sincera e o companheirismo de vocês é algo que levarei para toda vida.

À Nahtália e ao Wellington, amigos que a vida me presenteou e que passaram a dividir importantes momentos desta jornada. Vocês estiveram sempre presentes nos momentos bons, mas também me ajudaram a carregar fardos pesados em momentos difíceis. Obrigado por todas as datas especiais (natal, ano novo) que comemoramos juntos!

Agradeço a todos os produtores de leite, dos três estados brasileiros, que abriram as suas porteiras e permitiram a realização deste estudo. Sem dúvida a luta e o esforço diário dedicado à atividade leiteira trará bons frutos a cada um de vocês. Obrigado por acreditarem neste trabalho!

Por fim, agradeço a todos àqueles que aqui não citei, mas que de alguma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho...

Meu sincero muito obrigado!

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."
(Bertolt Brecht)*

RESUMO

FREU, G. **Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a saúde do úbere.** [Efficacy of internal teat sealant on dairy cows udder health at drying off]. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do selante interno de tetos (SIT) associado à terapia de vaca seca (TVS) na secagem de vacas leiteiras sobre os seguintes indicadores de saúde da glândula mamária: (a) cura bacteriológica de infecções intramamárias (IIM) na secagem, (b) risco de novas infecções intramamárias (NIIM) pós-parto, (c) cura e risco de novos casos de mastite subclínica (MSC), e (e) risco de mastite clínica (MC) pós-parto. Foram selecionadas 690 vacas no final de gestação (± 220 dias de gestação), provenientes de cinco rebanhos leiteiros localizados nos estados de Minas Gerais ($n = 3$), São Paulo ($n = 1$) e Paraná ($n = 1$). As vacas foram aleatoriamente distribuídas em dois protocolos de tratamento na secagem: a) TVS com 0,25 g cefalônio anidro (TVSA; Cepravin[®], MSD Saúde Animal), ou b) TVSA associado à SIT (TVSS; Cepravin[®], MSD Saúde Animal + Masti-Seal[®], MSD Saúde Animal). Foram coletadas amostras de leite dos quartos mamários das vacas selecionadas para cultura microbiológica no dia da secagem e aos 7 ± 3 e 14 ± 3 dias pós-parto (DPP); e para contagem de células somáticas (CCS), no dia da secagem e aos 14 ± 3 DPP. A ocorrência de MC foi registrada entre o dia da secagem até 60 DPP, e o número de casos de MC observados foi utilizado para calcular o risco de MC pós-parto. Quartos mamários foram considerados bacteriologicamente curados quando o agente causador da IIM isolado na secagem estava ausente em ambas as coletas pós-parto. As NIIM foram definidas quando foi isolado um agente causador de IIM em umas das amostras pós-parto diferente do isolado na secagem ou a presença de agentes causadores de mastite em quartos não infectados na secagem. A cura da MSC foi definida pela redução da CCS antes da secagem de >200.000 células/mL para ≤ 200.000 células/mL no pós-parto, ao passo que novos casos de MSC ocorreram quando a CCS antes da secagem foi ≤ 200.000 células/mL e após o parto foi >200.000 células/mL. Os dados de 1.756 quartos mamários (439 vacas) foram utilizados para avaliar o efeito dos tratamentos por regressão logística multivariada sobre os indicadores de saúde da glândula mamária. Não houve efeito dos tratamentos sobre o risco de cura bacteriológica de IIM, cura da MSC, novos casos de MSC pós-parto e de MC até 60 DPP. Por outro lado, a TVSS reduziu o risco geral de NIIM (19% vs. 14%) e por patógenos maiores em

relação à TVSA. Sendo assim, a TVS associada com SIT na secagem de vacas leiteiras é eficaz para prevenção de NIIM durante o período seco.

Palavras-chave: Cura bacteriológica. Novas infecções intramamárias. Período seco. Risco de mastite clínica. Subnitrato de bismuto.

ABSTRACT

FREU, G. **Efficacy of internal teat sealant on dairy cows udder health at drying off.** [Eficácia do selante interno de tetos na secagem de vacas leiteiras sobre a saúde do úbere]. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of internal teat sealant (ITS) associated with dry cow therapy (DCT) on the following mammary gland health indicators: (a) bacteriological cure of intramammary infections (IIM) at drying off, (b) risk of postpartum new intramammary infections (NIMI), (c) cure and risk of new cases of subclinical mastitis (SCM), and (e) risk of postpartum clinical mastitis (CM). There were selected 690 cows at the late-gestation (± 220 days) from five dairy herds located in Minas Gerais ($n = 3$), Sao Paulo ($n = 1$) and Parana ($n = 1$) states. Cows were randomly assigned into two treatment protocols at drying off: a) Antibiotic DCT (ADCT; 0.25g anhydrous cephalonium, Cepravin[®], MSD Animal Health), or b) ADCT plus ITS (SDCT 0.25 g anhydrous cephalonium + Masti-Seal[®], MSD Animal Health). Mammary quarter milk samples were collected from selected cows for microbiological culture at the drying off and at 7 ± 3 and 14 ± 3 days postpartum (DPP); and for somatic cell count (SCC) at drying off and 14 ± 3 DPP. The occurrence of CM was recorded between the day of drying off up to 60 DPP and the number of CM cases was used to calculate the risk of postpartum CM. The mammary quarters were considered bacteriologically cured when the IMI causative agent isolated at drying off was absent in both postpartum milk samples. A NIMI was defined as a mammary quarter from which no pathogens were cultured at drying off, but growth was detected in the postpartum sample or if a different pathogen of drying off was recovered in the postpartum sample. The SCM cure was defined as a reduction in SCC before drying off from $>200,000$ cells/mL to $\leq 200,000$ cells / mL postpartum, whereas new cases of SCM occurred when SCC before drying off was $\leq 200,000$ cells/mL and $>200,000$ cells/mL after calving. Data from 1,756 mammary quarters (439 cows) were used to evaluate the effect of multivariate logistic regression treatments on mammary gland health indicators. There was no effect of treatments on the risk of IMI bacteriological cure, cure of SCM, new cases of postpartum SCM and CM up 60 DPP. In contrast, SDCT reduced the overall risk of NIMI (19% vs. 14%) and the NIMI caused by major pathogens compared to ADCT. Thus, DCT associated with ITS at dairy cows drying off is effective for preventing NIMI during dry period.

Keywords: Bacteriological cure. New intramammary infections. Dry period. Clinical mastitis risk. Bismuth subnitrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração esquemática do risco de novas infecções intramamárias em vacas leiteiras durante o ciclo de lactação, e as divisões do período seco de acordo com suas fases: “A” involução ativa, “B” involução completa e “C” lactogênese.	27
Figura 2 - Radiografia de dois tetos demonstrando a presença e a posição do selante interno de tetos	40
Figura 3 - Esquema de coleta das amostras de leite (na secagem e pós-parto) das vacas submetidas aos protocolos de secagem para análise de cultura microbiológica e de CCS.....	43
Figura 4 - Resultados descritivos da CCS dos quartos mamários das amostras colhidas antes da secagem e após o parto (média e desvio padrão) de acordo com os grupos de tratamento avaliados	49
Figura 5 - Risco de cura (bacteriológica de IIM e de MSC) e de novas infecções e de MSC de acordo com os resultados de cultura e CCS de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem	53
Quadro 1 - Caracterização dos grupos experimentais, produtos, composição e posologia utilizados para secagem das vacas leiteiras selecionadas.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados descritivos das características das vacas selecionadas para o estudo (média e desvio padrão) e frequência da posição dos quartos mamários de acordo com os grupos de tratamento avaliados	49
Tabela 2 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas antes da secagem de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem.....	50
Tabela 3 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas aos 7 ± 3 DPP de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem.....	51
Tabela 4 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas aos 14 ± 3 DPP de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem.....	52
Tabela 5 - Resultados do modelo de regressão logística multivariada sobre os indicadores de saúde da glândula mamária (cura bacteriológica e da MSC e novos casos de MSC) das vacas submetidas aos protocolos de secagem	54
Tabela 6 - Risco (geral e por patógeno) de cura bacteriológica de quartos mamários submetidos aos protocolos de secagem	55
Tabela 7 - Regressão logística para efeito dos protocolos de secagem no risco de NIIM geral e por grupo de patógenos identificados 7 ± 3 e 14 ± 3 DPP	57
Tabela 8 - Frequência de patógenos isolados dos casos de NIIM (considerando isolamento aos 7 ± 3 ou 14 ± 3 DPP) de acordo com os protocolos de secagem	58
Tabela 9 - Regressão logística para efeito dos protocolos de secagem no risco de MC durante os primeiros 60 DPP	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CAMP	Teste de Christie, Atkins e Munch-Petersen
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CCST	Contagem de células somáticas do leite de tanque
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
CMT	<i>California mastitis test</i>
CONCEA	Conselho nacional de controle da experimentação animal
DEL	Dias em lactação
DP	Desvio padrão
DPP	Dias pós-parto
ECC	Escore de condição corporal
ENA	<i>Staphylococcus</i> não-aureus
ESALQ	Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GM	Glândula mamária
IIM	Infecção intramamária
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
MC	Mastite clínica
mL	Mililitro
MSC	Mastite subclínica
NAGase	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NIIM	Nova infecção intramamária
NMC	<i>National Mastitis Council</i>
PS	Período seco
SIT	Selante interno de tetos
TVS	Terapia de vaca seca
TVSA	Terapia de vaca seca com 0,25g de cefalônio anidro
TVSS	Terapia de vaca seca com 0,25g de cefalônio anidro associado à selante interno de tetos

UFC	Unidade formadora de colônia
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	HIPÓTESE.....	21
3	OBJETIVOS	21
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
4.1	MASTITE EM VACAS LEITEIRAS	22
4.2.1	Mastite clínica	23
4.2.2	Mastite subclínica	24
4.2.3	Mastite contagiosa e ambiental.....	25
4.2	PERÍODO SECO.....	26
4.2.1	Período de involução ativa	27
4.2.2	Período de involução completa	28
4.2.3	Período de lactogênese/colostrogênese	30
4.3	INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS NO PS	31
4.4	TERAPIA DE VACA SECA.....	33
4.4.1	Bases antimicrobianas usadas na TVS	34
4.4.2	Selante interno de tetos na TVS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS	41
5.2	SELEÇÃO DAS VACAS	41
5.3	COLETA DE DADOS DAS VACAS ANTES DA SECAGEM	41
5.4	CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS	41
5.5.1	Terapia de vaca seca	42
5.5.2	Terapia de vaca seca associada à SIT	42
5.5	COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE ANTES DA SECAGEM E APÓS O PARTO	43
5.4.1	Cultura microbiológica e contagem de células somáticas	43

5.4.2	Mastite clínica 60 DPP.....	44
5.6	CULTURA MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE.....	44
5.7	DEFINIÇÃO DE INDICADORES DE SAÚDE DO ÚBERE.....	45
5.7.1	Cura bacteriológica de IIM.....	45
5.7.2	Cura da mastite subclínica.....	46
5.7.3	Novos casos de mastite subclínica	46
5.7.4	Novas infecções intramamárias no pós-parto	46
5.7.5	Risco de mastite clínica	46
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6	RESULTADOS	48
6.1	VACAS SELECIONADAS.....	48
6.2	FREQUÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE.....	50
6.2.1	Amostras de leite coletadas antes da secagem.....	50
6.2.2	Amostras de leite coletadas após o parto	51
6.3	EFEITO DO SIT SOBRE A SAÚDE do ÚBERE.....	52
6.3.1	Cura bacteriológica de IIM.....	52
6.3.2	Cura da mastite subclínica.....	55
6.3.3	Novos casos de mastite subclínica	55
6.3.4	Nova infecção intramamária	56
6.3.5	Risco de mastite clínica pós-parto	58
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Durante o período seco (PS) das vacas leiteiras, a glândula mamária (GM) passa por alterações fisiológicas e histológicas que afetam a saúde do úbere e a produção de leite da próxima lactação (HURLEY et al., 1989; HENDERSON et al., 2016; JENA et al., 2019). Por este fato, a secagem é uma ótima oportunidade para tratar IIM existentes, embora também seja um período de alto risco ao desenvolvimento de novas infecções intramamárias (NIIM; MARTINS et al., 2019) e de ocorrência de mastite clínica (MC) na lactação subsequente (GUNDELACH et al., 2011).

O risco de NIIM durante o PS está relacionado com a capacidade de formação do tampão de queratina muco-gorduroso nos canais dos tetos que atua como barreira física contra a invasão microbiana na GM (DINGWELL et al., 2004; MCPARLAND et al., 2019). No entanto, a capacidade de produção deste tampão é variável entre as vacas (MOLINA et al., 2017), sendo que, 23% dos quartos mamários podem permanecer abertos por até seis semanas após a secagem (DINGWELL; KELTON; LESLIE, 2003) e 5% dos quartos mamários não apresentam tampão durante todo PS (WILLIAMSON; WOOLFORD; DAY, 1995). Quartos mamários sem formação de tampão de queratina apresentam 1,7 vezes mais chances de NIIM durante o PS do que quartos mamários com completa formação desta barreira (DINGWELL et al., 2003). Além disso, GMs infectadas durante o PS apresentam maior risco de MC após o parto (GREEN et al., 2002) e menor produção de leite em comparação com quartos mamários não infectados na mesma lactação (SMITH et al., 1968).

O uso de selante interno de tetos (SIT) na secagem é uma estratégia de prevenção das IIM durante o PS, já que mimetizam o tampão fisiológico de queratina, com objetivo de reduzir o acesso de microrganismos à GM (MEANEY, 1977). Huxley et al. (2002) relataram que vacas tratadas com SIT apresentaram menos IIM causadas por microrganismos ambientais do que as vacas que receberam apenas terapia de vaca seca (TVS). A associação de SIT com TVS na secagem também se mostrou eficiente no controle de NIIM quando comparados com quartos mamários não tratados (MEANEY, 1977) ou com aqueles que receberam apenas antibiótico (GOLDER et al., 2016). Resultados satisfatórios com uso de SIT também foram reportados na Europa (HUXLEY et al., 2002), Austrália (GOLDER; HODGE; LEAN, 2016) e América do Norte (MACHADO; BICALHO, 2018). No Brasil, estudo recente comparou dois protocolos para TVS associado ao SIT e sugeriu que a

formulação, volume, dosagem e viscosidade dos selantes poderiam influenciar na ocorrência de NIIM e de MC pós parto (MARTINS, et al 2019).

Embora a ação de proteção conferida pelos SIT durante o PS seja bem estudada em alguns países, existe uma crescente demanda por novos produtos capazes de aumentar a saúde da GM. Neste contexto, o presente estudo avaliou um novo SIT, a base de subnitrato de bismuto, como alternativa para prevenção de NIIM durante o PS.

2 HIPÓTESE

No presente estudo, avaliou-se a hipótese de que a infusão de SIT associado com a TVS de vacas leiteiras é mais eficaz na prevenção de NIIM durante o PS e na ocorrência de MC pós-parto do que a infusão isolada TVS.

3 OBJETIVOS

O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do SIT associado a TVS na secagem de vacas leiteiras sobre os seguintes indicadores de saúde da GM: (a) cura bacteriológica de IIM subclínicas na secagem, (b) risco de NIIM pós-parto, (c) cura e risco de novos casos de mastite subclínica (MSC), e (e) risco de MC pós-parto.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MASTITE EM VACAS LEITEIRAS

A mastite é a doença que mais acomete vacas leiteiras no mundo (RUEGG, 2017). Caracterizada por um processo inflamatório na GM, essa enfermidade é causa de altos prejuízos à cadeia leiteira (ROLLIN; DHUYVETTER; OVERTON, 2015). Dentre os efeitos negativos causados pela mastite, destacam-se a redução na qualidade e na quantidade do leite produzido (JANZEN, 1970; GONÇALVES et al., 2018), custos com tratamentos e honorários veterinários (VAN SOEST et al., 2016), além da redução da vida produtiva das vacas e aumento da taxa de descarte (HERTL et al., 2018).

Até meados do século XXI, a mastite era causada em sua maioria (80%) por patógenos primários ou principais (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*), classificados dessa forma devido a sua maior patogenicidade (BRADLEY, 2002). No entanto, com a implantação de programas de prevenção e controle dos agentes principais da mastite, os agentes secundários, como *Staphylococcus* não-aureus (ENA) e *Corynebacterium* spp. são atualmente importantes causas de mastite nos rebanhos leiteiros (TOMAZI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015).

Diferentes reservatórios de microrganismos causadores de mastite foram identificados (HOGAN; SMITH, 2003; ZADOKS et al., 2011; HOGAN; SMITH, 2012), o que sugere que esses agentes estariam adaptados a sobreviver em diferentes ambientes. RUEGG (2017) relatou que bactérias causadoras de IIM são capazes de colonizar a pele dos tetos, sendo este um importante reservatório de patógenos contagiosos. Por outro lado, o trato gastrointestinal de ruminantes, o solo, ingredientes da dieta e a água também foram relatados como possíveis fontes de contaminação da GM de vacas leiteiras por microrganismos ambientais (HOGAN; SMITH, 2003; ZADOKS et al., 2011; HOGAN; SMITH, 2012).

O início de novos casos de mastite está associado à invasão da GM por microrganismos via canal do teto, seja por patógenos contagiosos ou ambientais. Após a invasão do canal dos tetos, as bactérias podem utilizar os substratos disponíveis na secreção mamária para replicar-se e evadir das defesas do hospedeiro (HOGAN; SMITH, 2003). Além disso, também pode ocorrer a produção de toxinas pelas bactérias, que na maioria das vezes, são nocivas ao tecido mamário (SCHRICK et al., 2001).

A intensidade das lesões causadas pelos microrganismos e a resposta inflamatória da GM durante a colonização podem resultar em sintomatologias restritas à GM ou comprometer sistemicamente a saúde das vacas. Assim, pode-se classificar a mastite de acordo com a forma de apresentação em clínica (MC) e subclínica, e de acordo com o tipo de agente causador em contagiosa e ambiental (CERVINKOVA et al., 2013).

4.2.1 Mastite clínica

A MC é caracterizada por alterações visuais nas características físicas do leite e/ou na GM. Os sinais clínicos vinculados à MC incluem anormalidades no aspecto do leite (grumos, sangue ou pus) e/ou do úbere (vermelhidão e inchaço; REES; FISCHER-TENHAGEN; HEUWIESER, 2017). Além disso, alterações clínicas e comportamentais, como febre, letargia e desidratação podem ser observadas devido ao desconforto gerado pelo processo inflamatório (FOGSGAARD; BENNEDSGAARD; HERSKIN, 2015). Apesar disso, as alterações visíveis facilitam o diagnóstico da MC durante os procedimentos de ordenha (MOREIRA et al., 2018) e consequentemente o seu tratamento (SWINKELS et al., 2015).

Essa forma de manifestação da mastite pode ocorrer no PS ou durante a lactação das vacas, podendo acometer a mesma vaca mais de uma vez durante a lactação (HERTL et al., 2014). Fatores como estação do ano, tamanho do rebanho, sistema de alojamento, produção média de leite por vaca, contagem de células somáticas do leite de tanque (CCST) e contagem bacteriana total (CBT) podem estar associados com a prevalência de patógenos causadores de MC e com a taxa de incidência de MC nos rebanhos leiteiros (TOMAZI et al., 2018). Estudo avaliando 20 rebanhos leiteiros no Brasil, observou que rebanhos com CCST > 601.000 células/ml apresentaram maior taxa de incidência de MC do que rebanhos com CCST ≤ 600.000 células/mL (TOMAZI et al., 2018).

De acordo com a gravidade da MC é possível classificá-la em três escores: leve (1), quando presentes apenas alterações visíveis no leite; moderada (2), quando observada alterações visuais do leite acompanhadas de alterações no úbere decorrentes da inflamação (endurecimento, edema, dor e rubor localizado); e grave (3), quando identificada alteração visual do leite com sinais de inflamação no úbere e alterações sistêmicas (temperatura >39,5°C, inapetência, desidratação, depressão; WENZ; GARRY; BARRINGTON, 2006). No estudo de Tomazi et al. (2018), dos quase 6.000 casos de MC avaliados a maioria foi classificada como leve (60,3%), enquanto 34,1% foram moderados e 5,6% graves.

4.2.2 Mastite subclínica

A MSC é uma condição em que tanto o úbere quanto o leite apresentam-se livres de sinais clínicos visíveis, embora a GM da vaca esteja infectada (por algum microrganismo) e/ou inflamada (DAMM et al., 2017). Esse tipo de manifestação necessita ser constantemente monitorada, pois vacas com MSC podem servir como reservatório de patógenos (especialmente contagiosos) e transmitir para outras vacas dentro do mesmo rebanho ou outros quartos mamários de uma mesma vaca (KEEFE, 1997; RATO et al., 2008).

Na MSC, a resposta da GM frente à colonização por agentes patogênicos ocorre por meio da passagem de células de defesa ao sítio inflamatório, na tentativa de reverter o processo infeccioso. O somatório das células de defesa e células de descamação do epitélio secretor de leite nos alvéolos dão origem às células somáticas do leite. Portanto, quando a GM encontra-se infectada, a contagem de células somáticas (CCS) tende a ser elevada (HARMON, 1994b).

A CCS é a principal característica utilizada para avaliar a prevalência e incidência de vacas com de MSC nos rebanhos leiteiros (BUSANELLO et al., 2017). Quando a CCS é ≤ 200.000 células/mL é indicativo da ausência de IIM (DOHOO; LESLIE, 1991). Por outro lado, a CCS > 200.000 células/mL é indicativo de IIM, o que resulta em perdas em produção de leite (DÜRR et al., 2008; GONÇALVES et al., 2018) e em seus derivados (MAZAL et al., 2007). A realização da CCS individual por vaca, além de permitir o monitoramento da frequência de MSC, pode auxiliar na detecção de vacas com mastite crônica e direcionar as estratégias de prevenção e controle de novos casos de mastite.

Testes quantitativos, como a avaliação da CCS, ou qualitativos, como o *California Mastitis Test* (CMT), permitem monitorar alterações no número de células do leite das vacas durante a lactação. Enquanto a CCS determina a concentração de células somáticas por citometria de fluxo (SANTOS; FONSECA, 2019); o CMT estima a presença da mastite por meio da reação do leite com um detergente aniônico neutro, e é interpretado de acordo com intensidade da reação em escores que variam de zero (reação negativa) a três (fortemente positiva; SARGEANT et al., 2001; ROSSI et al., 2018).

4.2.3 Mastite contagiosa e ambiental

A mastite pode ser causada por diferentes microrganismos, como fungos, algas, vírus ou bactérias. Destes, a infecção bacteriana da GM é a mais frequente (RUEGG, 2017). A capacidade de adaptação aos diferentes reservatórios e o perfil de transmissão permite classificar os microrganismos em contagiosos ou ambientais (HOGAN; SMITH, 2003).

A mastite contagiosa é geralmente causada por bactérias adaptadas à GM (SMITH; HOGAN, 1993; CERVINKOVA et al., 2013) que apresentam potencial de disseminação entre as vacas ou entre os quartos mamários, principalmente durante a ordenha. Equipamentos de ordenha contaminados, mãos dos ordenhadores e uso de panos coletivos para secagem dos tetos podem servir como veículos de transmissão desses patógenos (KEEFE, 1997). A mastite contagiosa manifesta-se principalmente na forma subclínica, ao passo que sua apresentação na forma clínica é menos frequente (BRADLEY, 2002). Os principais patógenos causadores de mastite contagiosa são: *Strep. agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staph. aureus* e *Mycoplasma* spp. (CERVINKOVA et al., 2013).

A mastite ambiental é causada por bactérias cujo reservatório é o ambiente (SMITH; HOGAN, 1993; CERVINKOVA et al., 2013), dentre os quais se destacam os coliformes (*E. coli* e *Klebsiella* spp.) e os estreptococos ambientais (*Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* e *Enterococcus* spp.; HOGAN, JOE; SMITH, 2012). Estes microrganismos são invasores oportunistas da GM, capazes de migrar do ambiente contaminado através do canal do teto (ZEHNER et al., 1986; HOGAN; SMITH, 2003). O acesso de bactérias oportunistas ao tecido mamário resulta em resposta inflamatória imediata, com aumento crescente no número de neutrófilos provenientes dos processos quimiotáticos. Esse mecanismo de defesa é desencadeado para evitar a fuga e a multiplicação dos patógenos no interior da GM (BURVENICH et al., 2003). A manifestação da mastite ambiental pode ocorrer tanto na forma clínica quanto subclínica, de acordo com as características da vaca, do agente causador ou do ambiente (OLIVEIRA et al., 2015).

No entanto, com a disponibilidade de técnicas de diagnóstico mais precisas (ferramentas moleculares) tem sido possível ampliar o conhecimento sobre o comportamento epidemiológico dos microrganismos causadores de mastite bovina. E, com isso, a distinção clássica entre agentes contagiosos e ambientais parece ter cada vez menos sustentação (ZADOKS et al., 2011). Estudo demonstrou que agentes com perfil de transmissão ambiental também podem apresentar perfil contagioso e vice-versa (ZADOKS; SCHUKKEN, 2006).

4.2 PERÍODO SECO

O PS é o intervalo de tempo entre duas lactações, no qual a vaca não está lactante. Durante este período ocorre a involução da GM e intensas alterações fisiológicas e histológicas que preparam a glândula para lactação subsequente (HURLEY, 1989; HENDERSON et al., 2016; JENA et al., 2019). Além de regenerar e preparar o tecido mamário para próxima lactação, o PS também desempenha importante papel no controle de NIIM e na cura de infecções da lactação anterior (LEELAHAPONGSATHON et al., 2016). Falhas durante este período predisõem a ocorrência de NIIM e têm efeitos negativos sobre a produção de leite da lactação subsequente (PANTOJA; HULLAND; RUEGG, 2009).

Tradicionalmente, o PS recomendado para vacas leiteiras é de aproximadamente 60 dias (BERNIER-DODIER et al., 2011; RAJALA-SCHULTZ et al., 2018), sendo este intervalo utilizado com rotina nas fazendas há quase um século (ARNOLD; BECKER, 1936). No entanto, estudos recentes têm sugerido a redução do PS (e.g., <40 dias) com o objetivo de aumentar a lactação sem que ocorram prejuízos para saúde e para a próxima lactação das vacas (KOK et al., 2017). Em metanálise com dados de 24 estudos, VAN KNEGSEL et al. (2013) relataram que encurtar o PS ou até mesmo omiti-lo aumenta o teor de proteína do leite e reduz as chances de cetose na lactação subsequente. Por outro lado, encurtamento do PS pode reduzir a produção de leite da próxima lactação (HURLEY, 1989; VAN KNEGSEL et al., 2013).

A renovação das células da GM foi maior em vacas que passaram por PS de oito semanas quando comparadas a vacas sem PS entre uma lactação e outra (CAPUCO, AKERS; SMITH; 1997). Estes resultados indicam a importância do PS para permitir que as células epiteliais mamárias senescentes sejam substituídas e renovadas antes do parto, visto que esta renovação celular entre uma lactação e outra é uma das condições responsáveis pelo pico de produção de leite na próxima lactação (CAPUCO et al., 2001). Para auxiliar na compreensão das alterações fisiológicas do PS, é conveniente dividi-lo em três períodos: involução ativa, involução completa e lactogênese/colostrogênese (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração esquemática do risco de novas infecções intramamárias em vacas leiteiras durante o ciclo de lactação, e as divisões do período seco de acordo com suas fases: “A” involução ativa, “B” involução completa e “C” lactogênese.

Fonte: Adaptado de Bradley e Green (2004).

4.2.1 Período de involução ativa

A fase de involução ativa compreende o intervalo de tempo entre a secagem e os 21 primeiros dias do PS. Esta fase de transição inicia-se com a interrupção da ordenha e resulta em alterações na composição da secreção mamária (HURLEY, 1989). Uma vez interrompida a ordenha da vaca, ocorre aumento da pressão intramamária devido ao acúmulo de leite não ordenhado nos ductos, cisterna e alvéolos mamários. Esse aumento da pressão intramamária está associado com a degeneração das células mamárias e a modificação da intensidade da atividade secretora das células epiteliais dos alvéolos mamários (OLIVER; SORDILLO, 1989).

A composição da secreção mamária muda substancialmente durante a involução. Observa-se diminuição significativa da síntese de constituintes do leite tais como caseína, lactose e gordura de 3 a 4 dias após a secagem (SANTOS; FONSECA, 2007). Por outro lado, a contagem de leucócitos aumenta nas secreções durante a involução inicial (MCDONALD; ANDERSON, 1981b), sendo que os neutrófilos predominam durante os primeiros dias e, posteriormente, macrófagos e linfócitos são os tipos de células predominantes (JENSEN; EBERHART, 1981). Os leucócitos, durante o PS, estão envolvidos na fagocitose dos

constituintes residuais do leite (LEE; MCDOWELL; LASCELLES, 1969) e na proteção da glândula contra invasão bacteriana (SORDILLO, 2018). No entanto, tanto a gordura quanto a caseína fagocitadas modificam a morfologia das células de defesa e reduzem a atividade destas células frente aos microrganismos (PAAPE et al., 2003).

Lactoferrina, enzimas hidrolíticas, imunoglobulinas e componentes derivados do soro também têm as concentrações aumentadas nas secreções mamárias durante o processo de involução ativa (HURLEY, 1989). As concentrações de lactoferrina aumentam continuamente tornando-a uma das principais proteínas das secreções mamárias durante este período (NEWMAN et al., 2009). Em estudo americano, Welty, Smith e Schanbacher (1976) detectaram concentração de 20 mg/mL de lactoferrina na secreção da GM em um período de três a quatro semanas após o início da involução ativa. Esses resultados representam aumento de 100 vezes na concentração de lactoferrina em relação ao leite normal, o que sugere estreita relação entre o aumento da lactoferrina e o processo de involução da GM.

A lactoferrina possui propriedades antibacterianas e pode atuar como imunomodulador (HUANG et al., 2012). Este composto apresenta alta afinidade pelo ferro livre disponível na secreção mamária, tornando-o indisponível para o crescimento bacteriano no ambiente mamário (BAKER; BAKER, 2012), podendo inibir este crescimento (WEINBERG, 1978; SHIMAZAKI; KAWAI, 2017). Naidu et al. (1991) relataram a ação antimicrobiana da lactoferrina *in vitro* para inibição do crescimento de *Staph. aureus*, sugerindo que esta proteína atua na defesa não específica na GM.

Apesar de complexos mecanismos de defesa durante a fase de involução ativa, há maior risco da GM de apresentar NIIM (Figura 1). Após a interrupção da ordenha, a contínua produção de leite nos primeiros dias do PS resulta em acúmulo de leite na GM. Juntamente com o acúmulo de leite pode haver ingurgitamento do úbere, encurtamento e dilatação do canal do teto, levando ao vazamento de leite e risco de invasão de microrganismos (NICKERSON, 1989; PONCHON et al., 2017). Na primeira semana da fase de involução ativa ocorrem 8,5% de NIIM, e na segunda e terceira semana as taxas são de 3,3%, e 0,05%, respectivamente, ao passo que na quarta semana não foram observadas NIIM (Eberhart, 1982).

4.2.2 Período de involução completa

No final do período de involução ativa, aproximadamente 21 dias após a interrupção

da ordenha, inicia-se o período de involução completa. A duração deste período de involução depende da duração total do PS. Neste período, a GM torna-se totalmente involuída, sendo os principais constituintes do leite presentes em concentrações muito reduzidas (MCDONALD; ANDERSON, 1981b; SCHUKKEN; GURJAR; MORONI, 2011). Há predomínio de linfócitos e macrófagos no interior da GM (MCDONALD; ANDERSON, 1981a) e a proporção de neutrófilos que era inicialmente alta (durante a involução ativa) reduz à medida que o PS progride (JENSEN; EBERHART, 1981).

Por outro lado, quartos mamários persistentemente infectados apresentam maiores contagens de células totais (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) do que quartos mamários não infectados (JENSEN; EBERHART, 1981). Correlacionada ao aumento de linfócitos no interior da GM está a enzima glicosídica N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase; OBARA; KOMATSU, 1984), cuja função não é completamente conhecida (HURLEY, 1989). Esta enzima é relacionada com dano tecidual à GM frente às IIM (KITCHEN et al., 1980; BARTH et al., 2010). No entanto, apesar desta relação, estudo recente observou que a CCS apresentou maior eficácia na detecção de IIM em vacas em comparação com a Lactato desidrogenase (LDH) e NAGase (NYMAN; EMANUELSON; WALLER, 2016).

Durante o período de involução completa a GM apresenta alta resistência às NIIM (Figura 1; BRADLEY; GREEN, 2004), principalmente devido à formação completa do tampão de queratina que constitui uma barreira física natural dos canais dos tetos da vaca (DINGWELL et al., 2004; MCPARLAND et al., 2019). Este tampão é uma barreira muco-gordurosa que oclui o canal do teto durante o PS, visto que há diminuição da área e espessura das células epiteliais viáveis (extrato granuloso) e aumento das células epiteliais cornificadas, originando uma camada espessa de queratina (COMALLI et al., 1984). Esta queratina é composta principalmente por lipídios provenientes da gordura do leite (DINGWELL; KELTON; LESLIE, 2003), sendo muito diferente entre vacas secas e vacas em lactação (BITMAN et al., 1988). Portanto, a menor ocorrência de IIM durante a involução completa relaciona-se com fatores antimicrobianos presentes na secreção mamária (células de defesa, lactoferrina e imunoglobulinas) e com a barreira física formada pelo tampão muco-gorduroso presente no canal dos tetos. Estas características, associada à oclusão (por contração) do esfíncter do teto dificultam a invasão bacteriana (MCDONALD; ANDERSON, 1981b; BRADLEY; GREEN, 2004).

Entretanto, podem ocorrer atrasos ou falhas na formação do tampão de queratina em parte das vacas, o que representa um fator de risco para a ocorrência de NIIM no PS. Quartos

mamários com ausência do tampão apresentam 1,7 vezes mais chances de NIIM durante o PS do que quartos mamários com completa formação desta barreira (DINGWELL et al., 2003). De fato, estudo desenvolvido na Nova Zelândia observou que 50% do total de canais de teto avaliados não possuíam tampão de queratina nos primeiros 10 dias após a secagem, e destes, 5% não apresentaram este tampão durante todo o PS (WILLIAMSON; WOOLFORD; DAY, 1995). Este mesmo estudo também demonstrou que do total de casos de MC registrados durante o PS, 97% ocorreram em quartos mamários sem a presença do tampão de queratina, reforçando a ação de proteção que este tampão confere aos tetos durante o PS.

4.2.3 Período de lactogênese/colostrôgênese

A lactogênese inicia por volta das duas semanas que antecedem a data do parto e consiste na transição entre o final do PS e início da lactação (HURLEY, 1989; NICKERSON, 1989). A fim de entender as alterações morfológicas que ocorrem na GM de vacas leiteiras próximo ao parto, pesquisadores americanos avaliaram por microscopia eletrônica GMs durante período de involução e lactogênese. Foi observado que durante a involução ativa, houve aumento no estroma e no epitélio secretor inativo, com consequente diminuição do lúmen e epitélio secretor ativo. Ainda, em análise do epitélio alveolar foi observada redução do número de organelas associadas à síntese e à secreção láctea. No entanto, quanto mais próximo do parto (lactogênese), as alterações morfológicas descritas se inverteram gradualmente, resultando em estruturas celulares típicas de GMs lactantes (SORDILLO; NICKERSON, 1988).

Próximo ao parto, a GM passa por transições marcadas por crescimento intenso, rápida diferenciação das células epiteliais secretoras e síntese e secreção de proteínas, gordura, carboidratos e imunoglobulinas, que resultam no acúmulo de colostro (OLIVER; SORDILLO, 1988; SORDILLO; NICKERSON, 1988). O acúmulo de colostro aumenta a pressão intramamária e resulta no encurtamento e dilatação do canal do teto, favorecendo o desprendimento do tampão de queratina (OLDHAM et al., 1991) e aumento da suscetibilidade da GM à IIM, especialmente por bactérias de origem ambiental (Figura 1; NICKERSON, 1989; SCHUKKEN; GURJAR; MORONI, 2011).

O edema da GM próximo ao parto é uma condição que dificulta a oclusão do orifício do teto (NICKERSON, 1989), o que também favorece a invasão bacteriana da GM. Quando as bactérias acessam a GM durante a lactogênese encontram altas concentrações de citrato

(PEAKER; LINZELL, 1975), considerado ótimo substrato para crescimento bacteriano, e que pode favorecer o estabelecimento da infecção.

Durante a lactogênese, há redução da atividade de neutrófilos e macrófagos (principal tipo celular deste período) devido ao acúmulo de gordura na secreção láctea, responsável por inibir a ação destas células (OLIVER; SORDILLO, 1988; PAAPE et al., 2003). Há também, diminuição no número de linfócitos seguida de redução dos teores de lactoferrina láctea (SCHANBACHER; SMITH, 1975) o que aumenta a suscetibilidade das vacas às IIM no final do PS.

Apesar da diminuição dos linfócitos durante a lactogênese, as concentrações de imunoglobulinas, especialmente a IgG₁, aumentam próximo ao parto atingindo a máxima concentração por volta de 5 a 10 dias antes do parto (SANTOS; FONSECA, 2019). Essas imunoglobulinas lácteas auxiliam na proteção da GM contra agentes patogênicos causadores de mastite. Estudo avaliou a infusão de toxina bacteriana (α -hemolisina estafilocócica) na GM e observou aumento nas concentrações de imunoglobulinas, principalmente IgG₁, e em menor grau da IgG₂ (SYMONS; WRIGHT, 1974).

4.3 INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS NO PS

A prevalência de MC e MSC no início da lactação pode ter origem em NIIM durante o PS ou até mesmo a permanência de infecções provenientes da lactação anterior (BRADLEY; GREEN, 2004; GREEN et al., 2007). Glândulas mamárias infectadas durante o PS possuem risco maior de ocorrência de MC durante a próxima lactação, em comparação com as GMs não infectadas (BRADLEY; GREEN, 2000). Os casos de MC pós-parto ocorrem em taxa mais rápida nas vacas consideradas infectadas durante o PS em comparação com as não infectadas durante este período (GREEN et al., 2002). Além disso, dos casos de MC ocorridos nos primeiros 100 dias de lactação, 52,6% surgem em quartos mamários previamente considerados infectados (BRADLEY; GREEN, 2000).

A mastite tem efeito negativo na produção de leite ao longo da lactação, sendo que após a vaca adquirir IIM a mesma pode tornar-se produtivamente ineficiente (RAJALA-SCHULTZ et al., 1999; JAMALI et al., 2018). Quartos mamários infectados no PS produzem 35% menos leite quando comparados com quartos mamários não infectados na mesma lactação (SMITH et al., 1968). De forma semelhante, Rajala-Schultz et al. (1999) demonstraram que para casos de MC em estágio inicial da lactação as perdas diárias variam

de 1,1 a 2,5 Kg de leite, representando 294 a 552 Kg de perda em uma lactação de 305 dias. Além da redução na produção de leite, para cada caso adicional de MC ocorrido nos primeiros 100 dias da primeira lactação aumentou-se em 34% o risco de descarte das vacas (HERTL et al., 2018).

As alterações que acontecem na GM durante a involução, tais como: a) volume de leite acumulado após interrupção da ordenha (PONCHON et al., 2017); b) volume de colostro acumulado próximo ao parto; c) aumento da pressão intramamária (SORDILLO; NICKERSON, 1988); d) redução da atividade das células de defesa (PAAPE et al., 2003); e e) ausência de formação do tampão de queratina (MCPARLAND et al., 2019). E, fatores de risco ambiental (e.g., excesso de umidade, lama, fezes) apresentam relação com a incidência de IIM durante o PS e pós-parto.

Os primeiros dias após a secagem (período de involução ativa) são críticos para as vacas leiteiras devido ao alto risco de NIIM (Figura 1; PONCHON et al., 2017). O risco de IIM ao parto aumenta em 77% para cada 5 Kg de leite produzido acima de 12,5 Kg no momento da secagem (RAJALA-SCHULTZ; HOGAN; SMITH, 2005). Neste mesmo estudo, a alta produção de leite na secagem pode induzir o vazamento de leite e retardar a formação do tampão de queratina, mantendo o canal do teto desprotegido (aberto; RAJALA-SCHULTZ; HOGAN; SMITH, 2005), e favorecendo a invasão bacteriana na GM.

O método de secagem das vacas, abrupta ou gradual, também apresenta relação com a ocorrência de NIIM no PS. Vacas submetidas à secagem gradual tem menor produção de leite e menor vazamento de leite após a última ordenha (ZOBEL et al., 2013). O risco de MC no PS foi quatro vezes maior nas vacas que apresentaram vazamento de leite após a secagem em comparação com as que não tiveram vazamento de leite (SCHUKKEN et al., 1993). Além disso, houve menor incidência de IIM ao parto de vacas primíparas submetidas à secagem gradual (GOTT et al., 2016). Embora a secagem abrupta seja um procedimento comumente utilizado em muitos países, devido ao tamanho dos rebanhos e a intensificação dos sistemas (BARKEMA et al., 2015), a secagem gradual pode ajudar a melhorar a saúde e o conforto das vacas. Além disso, a secagem gradual reduz a produção de leite antes da ordenha final, especialmente em vacas leiteiras de alta produção (RAJALA-SCHULTZ et al., 2018).

A inserção total da cânula da bisnaga de antibiótico de vaca seca e o escore de condição corporal (ECC) durante o PS e após o parto também foram associados com a ocorrência de IIM no PS (LEELAHAPONGSATHON et al., 2016). A inserção total da cânula durante a TVS resulta na dilatação do canal do teto e na remoção de maiores quantidades de

queratina que protege o canal, o que aumenta risco de patógenos serem introduzidos na GM (BODDIE; NICKERSON, 1986; MCDUGALL, 2003). Por outro lado, valores de ECC muito baixos podem indicar uma nutrição inadequada (LEELAHAPONGSATHON et al., 2016), tornando as vacas mais suscetíveis à ocorrência de mastites. Parte disso pode estar atribuído aos níveis inadequados de ingestão de vitamina E e selênio, importantes compostos relacionados com a imunidade, que comprometem os mecanismos de defesa da GM (O'ROURKE, 2009). A situação inversa também é prejudicial para a saúde do úbere das vacas no PS. Vacas muito gordas (ECC alto) tem mais chances de entrar em balanço energético negativo pós-parto, e devido à mobilização de suas reservas corporais há o aumento da concentração de corpos cetônicos. A hipercetonemia reduz a atividade fagocitária e bactericida de leucócitos e neutrófilos, a produção de citocinas e a capacidade quimiotática das células. Dessa forma, assim como em vacas malnutridas, há comprometimento dos mecanismos de defesa do úbere e o estabelecimento de IIM (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

O monitoramento da CCS no momento da secagem e no pós-parto foi sugerido como indicador da saúde do úbere nestes períodos (WHIST; OSTERAS, 2006), além de ser útil para estimar o risco de MC na lactação subsequente (PANTOJA; HULLAND; RUEGG, 2009). Estudo objetivou avaliar o risco de MC nos primeiros 120 dias de lactação com base no histórico de CCS na secagem (PANTOJA; HULLAND; RUEGG, 2009). Como resultado, quartos mamários com CCS ≥ 200.000 células/mL na secagem e pós-parto apresentaram 2,7 vezes mais chances de desenvolver IIM do que os quartos mamários com CCS < 200.000 células/mL em ambos os períodos. Neste mesmo estudo, as vacas consideradas infectadas na secagem e no pós-parto produziram menos leite do que as vacas não infectadas (PANTOJA; HULLAND; RUEGG, 2009).

Diante disso, com objetivo de eliminar as IIM existentes e prevenir a ocorrência de NIIM durante o PS algumas estratégias estão disponíveis, dentre elas, a TVS (SCHERPENZEEL et al., 2014).

4.4 TERAPIA DE VACA SECA

A TVS consiste na infusão intramamária de antibióticos de longa ação e/ou SIT em cada quarto mamário após a última ordenha da lactação (BERRY; HILLERTON, 2002). Esta prática foi utilizada pela primeira vez por Pearson (1951) como método de controle da mastite

ambiental, e, tem sido implementada por quase 50 anos como parte do programa de controle da mastite (NEAVE et al., 1969).

O uso da TVS é recomendado para todas as vacas em final da lactação, uma vez que a taxa de cura contra IIM no PS é superior à terapia com antibiótico durante a lactação (NATZKE, 1971). Além do sucesso na cura de IIM, a TVS também tem baixo risco de contaminação do leite com antibióticos, reduz a ocorrência de infecções nos quartos infundidos, reduz a exposição de outras vacas no rebanho a patógenos causadores de mastite, e possibilita a regeneração do tecido mamário danificado durante o PS preparando-o para maior produção de leite na lactação seguinte (RINDSIG et al., 1978; ARRUDA et al., 2013a).

Diferentes vias de administração dos antimicrobianos (sistêmica, intramamária ou múltiplas infusões) na TVS foram avaliadas em relação à eficácia na cura de IIM. Segundo Natzke (1982) e Cummins e McCaskey (1987), múltiplas infusões de antibiótico no PS não apresentam benefícios para saúde do úbere e, pelo contrário, podem aumentar o risco de introdução de patógenos na GM (NATZKE, 1982). A falta de benefícios à saúde do úbere também foi observada na administração da TVS pela via sistêmica em comparação com a via intramamária (BOLOURCHI; HOVARESHTI; TABATABAYI, 1995). O aumento na taxa de cura alcançado com a terapia pela via sistêmica (comparado com a terapia intramamária) é descrito como insuficiente para justificar o custo do tratamento extra (relação custo:eficácia; BRADLEY; GREEN, 2004). Estes resultados sugerem que a TVS por via intramamária continua sendo o método mais eficaz para controlar IIM (BOLOURCHI; HOVARESHTI; TABATABAYI, 1995).

Atualmente, a administração de antimicrobianos de longa ação por via intramamária combinada ou não com SIT é usada com finalidade terapêutica (para tratar infecções presentes no final da lactação; MCPARLAND et al., 2019). Na Irlanda, por exemplo, a TVS faz parte do plano de controle da mastite e é usada em quase 100% das vacas (MORE; CLEGG; MCCOY, 2017). Em contraste, apenas cerca de 20% dos rebanhos brasileiros usam a TVS de rotina, e não existe um plano nacional de controle da mastite (FARRE et al., 2017).

4.4.1 Bases antimicrobianas usadas na TVS

A antibioticoterapia no PS foi desenvolvida na década de 40, sendo inicialmente utilizada para controlar mastites de verão (PEARSON, 1951). Mais tarde, na década de 60, a terapia com antibióticos no PS foi incluída no plano de cinco pontos de controle da mastite

(SMITH et al., 1967) e direcionada para o controle de patógenos contagiosos (BRADLEY; GREEN, 2001). A partir de então, a infusão de antibiótico na TVS expandiu e, atualmente, é utilizada em diversos países (BRADLEY; GREEN, 2004; LEELAHAPONGSATHON et al., 2016; MORE; CLEGG; MCCOY, 2017; MACHADO; BICALHO, 2018).

A infusão de antibióticos na secagem de vacas leiteiras atua na cura de IIM pré-existentes, além de evitar NIIM durante o PS (SMITH; NEAVE; DODD, 1966; JOHNSON et al., 2016). Estudo desenvolvido na Universidade de Cornell demonstrou que o tratamento para mastite com antibiótico durante a lactação eliminou 58,4% de todos os patógenos isolados em comparação com 92,5% de eliminação com terapia durante o PS (ROBERTS et al., 1969). Adicionalmente, na Nova Zelândia, estudo avaliou a eficácia do uso de antibiótico na secagem de 1.657 vacas provenientes de 97 rebanhos (SCHERPENZEEL et al., 2014). No momento da secagem, o úbere foi dividido em dois quartos mamários laterais, sendo dois quartos tratados com antibiótico (penicilina) e outros dois quartos sem tratamento (controle). A CCS pós-parto foi maior no grupo controle em relação ao grupo tratado. Além disso, a taxa de incidência de MC foi 1,7 vezes maior nos quartos mamários sem antibiótico (SCHERPENZEEL et al., 2014). De forma complementar a estes resultados, Halasa et al. (2009) relataram que vacas submetidas a TVS apresentaram 1,78 vezes maior cura do que vacas que não foram tratadas na secagem. Estes resultados sustentam a ideia de que GMs secas sem nenhum tratamento apresentam maiores chances de ter NIIM no início da lactação (SCHERPENZEEL et al., 2014).

Os antibióticos utilizados na TVS eram predominantemente de curto espectro contra patógenos Gram-positivos, como *Strep. agalactiae* e *Staph. aureus*. Isto, aliado a implementação do plano de controle da mastite permitiu a alguns países (e.g., Reino Unido) controlar a incidência de mastite por patógenos contagiosos. Sendo assim, o uso de TVS resultou em mudança na incidência e na etiologia das mastites, sendo que os agentes patogênicos ambientais tornaram-se cada vez mais comuns (BRADLEY; GREEN, 2001; BRADLEY et al., 2011). No entanto, no Brasil, patógenos contagiosos continuam sendo um problema para as fazendas leiteiras (FARRE et al., 2017; TOMAZI et al., 2018). Por isso, antimicrobianos de amplo espectro foram desenvolvidos para atuar tanto contra patógenos ambientais quanto contagiosos.

O espectro de ação de antimicrobianos (amplo vs. curto) foi comparado na TVS de acordo com a incidência de NIIM no PS e a ocorrência de MC nos primeiros 100 dias da lactação (BRADLEY et al., 2011). Vacas tratadas com antibiótico de amplo espectro

(cefquinoma) tiveram menor risco de ocorrência de MC do que o grupo tratado com antibiótico de curto espectro (cloxacilina; BRADLEY et al., 2011). Estudo adicional demonstrou que a seleção de TVS com atividade prolongada contra microrganismos Gram-negativos poderia resultar em redução de 53% na MC causada por coliformes no início da lactação em comparação com uma TVS sem atividade Gram-negativa (BRADLEY; GREEN, 2001).

Resultados similares com uso de antimicrobianos na TVS também foram descritos na Austrália (GOLDER; HODGE; LEAN, 2016), Europa (OSPINA et al., 2016), EUA (MACHADO; BICALHO, 2018) e no Brasil (MOLINA et al., 2017; MARTINS et al., 2017). Na Nova Zelândia, foi avaliada a eficácia de três formulações comerciais utilizadas na TVS: penicilina/di-hidroestreptomicina, cloridrato de ceftiofur e cefapirina benzatina, sendo que não houve diferença entre as três formulações testadas sobre a prevalência de IIM pós-parto, cura bacteriológica durante o PS e NIIM durante o PS (ARRUDA et al., 2013a; b). Além disso, os antimicrobianos testados foram eficientes em eliminar as IIM existentes, apresentando cura bacteriológica de aproximadamente 90% (ARRUDA et al., 2013a; b). Ospina et al. (2016) também não observaram diferenças sobre a cura bacteriológica, risco de novas IIM e risco de MC na lactação ao avaliar duas formulações comerciais a base de cefazolina e cefalônio em rebanhos leiteiros na Itália. Ainda, os mesmos autores relataram cura microbiológica de 94 e 95% para cefazolina e cefalônio, respectivamente.

Existem controvérsias em relação à eficácia do antibiótico para a proteção de quartos mamários na secagem. Williamson, Woolford e Day (1995) indicaram benefícios à saúde do úbere quando o antibiótico foi infundido de maneira profilática na TVS, já que foi capaz de reduzir o número de NIIM por *Strep. uberis* durante o PS. Curiosamente, os mesmos autores também observaram que quartos mamários tratados com antibiótico intramamário apresentaram maior taxa de desenvolvimento do tampão de queratina. Este fato não está totalmente elucidado, mas sugere que algum microrganismo atue retardando o fechamento completo do canal do teto (BRADLEY; GREEN, 2004). Algumas pesquisas sugeriram *Corynebacterium bovis* devido suas propriedades queratinolíticas (FUNKE et al., 1997), no entanto, segundo Bradley e Green (2004) o papel deste microrganismo na formação do tampão de queratina é complexo e necessita de mais estudos.

Bradley e Green (2000) observaram que nos primeiros 100 dias pós-parto (DPP), 50% dos quartos mamários com MC foram infectados por patógenos de origem ambiental durante o PS, sendo as vacas deste estudo tratadas com antibiótico no momento da secagem. Este fato

pode estar atribuído à redução dos níveis de antibiótico no final do PS, que ficam abaixo da concentração inibitória mínima, e desta forma, não conferem a proteção esperada durante todo o PS. Há relatos que a maioria das formulações de antibióticos persistem apenas até a metade do PS, o que aumenta o risco de IIM no final deste período (GRUET et al., 2001), especialmente pelas alterações que ocorrem na GM durante a fase de colostrogênese.

Embora o uso de antimicrobianos na TVS seja justificado, a presença de resíduos de antibióticos no leite, especialmente no caso de vacas que por algum motivo tem PS mais curto que o esperado (OLIVER et al., 1992; BACHMANN et al., 2018), e o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos podem limitar o seu uso durante a secagem. Diante da preocupação com o uso imprudente de antibióticos, pesquisas recentes têm buscado estratégias não antibióticas, e por isso, SITs aplicados no momento da secagem de vacas leiteiras vêm sendo investigados (MCDOUGALL et al., 2009; BONSAGLIA et al., 2017).

4.4.2 Selante interno de tetos na TVS

Selantes internos de tetos são estratégias de prevenção de NIIM durante o PS e constituem-se como medida alternativa e/ou complementar à TVS convencional (RABIEE; LEAN, 2013; CAMERON et al., 2014). Os primeiros SITs foram desenvolvidos na década de 70, com composição baseada em sal inorgânico pesado (subnitrato de bismuto) capaz de mimetizar os mecanismos fisiológicos de fechamento do canal do teto (MEANEY, 1977). Selantes interno de tetos atuam como barreira física inerte na cisterna dos tetos, e podem ser utilizados de forma isolada ou em associação com antibióticos para prevenção de IIM no PS (BERRY; HILLERTON, 2002).

Após a secagem, forma-se um tampão de queratina muco-gorduroso nos canais dos tetos, o qual atua como barreira física e bacteriostática à invasão microbiana da GM (DINGWELL et al., 2004; MCPARLAND et al., 2019). No entanto, a capacidade de produção do tampão de queratina varia entre as vacas (MOLINA et al., 2017). Há relatos de que 23% dos quartos mamários podem permanecer abertos por até seis semanas após a secagem (DINGWELL; KELTON; LESLIE, 2003) e que 5% dos quartos mamários não apresentaram tampão de queratina durante todo o PS (WILLIAMSON; WOOLFORD; DAY, 1995). Dessa forma, fazer uso de alternativas capazes de mimetizar o tampão de queratina (e.g., SIT) pode reduzir a ocorrência de IIM durante o PS.

Um dos primeiros estudos sobre o uso de SIT em vacas leiteiras foi desenvolvido na Irlanda, em uma série de três experimentos (MEANEY, 1977). No primeiro, vacas previamente identificadas como não infectadas receberam SIT em dois quartos mamários no momento da secagem, enquanto os demais quartos foram considerados controles não tratados. O número de NIIM foi significativamente maior nos quartos mamários não tratados em comparação com os quartos tratados (9 vs. 1, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados no segundo experimento, em que quartos mamários não tratados apresentaram maior número de NIIM do que os quartos que receberam SIT associado com antibiótico (11 vs. 2, respectivamente). Já no terceiro experimento de Meaney (1977), o SIT associado com antibiótico foi infundido em quartos mamários considerados infectados e foi observada alta taxa de cura das infecções durante o PS.

Posteriormente, estudos adicionais avaliaram a eficácia do SIT na prevenção de NIIM (WOOLFORD et al., 1998; BERRY; HILLERTON, 2002), e demonstraram benefícios à saúde do úbere. Woolford et al. (1998) comparou a eficácia profilática dos selantes, sugerindo ser a mesma descrita para antibióticos infundidos no momento da secagem. Enquanto isso, Berry e Hillerton (2002) relataram redução no número de NIIM pós-parto e na ocorrência de MC após 100 dias de lactação ao comparar quartos mamários tratados com SIT vs. não tratados.

Resultados similares com uso de SIT também foram relatados no Reino Unido (HUXLEY et al., 2002), Austrália (GOLDER; HODGE; LEAN, 2016), Estados Unidos (MACHADO; BICALHO, 2018) e Brasil (CARNEIRO-FILHA et al., 2006). No Reino Unido, Huxley et al. (2002) compararam o uso de SIT (65% de subnitrato de bismuto) com a terapia com antibiótico intramamário (250mg de cefalônio). Vacas tratadas com SIT apresentaram menos IIM por microrganismos ambientais do que as vacas que receberam apenas antibiótico. Além disso, não foi observada diferença entre a ocorrência e a gravidade dos casos de MC nos primeiros 100 dias de lactação. Apesar destas evidências, o uso isolado do selante é aconselhado apenas em vacas com um baixo registro de CCS (RABIEE; LEAN, 2013).

Na Austrália, Golder, Hodge e Lean (2016) avaliaram dois protocolos de secagem: TVS + SIT (protocolo I) e TVS (protocolo II). Vacas que receberam o protocolo II apresentaram 1,9 vezes mais chances de desenvolverem MSC em comparação com as vacas do protocolo I. Este fato sugere que o uso combinado de TVS com SIT proporciona benefícios à saúde da GM. O efeito benéfico da combinação TVS com SIT também foi

descrito em novilhas; representado pela redução na incidência de MC e MSC durante os primeiros nove meses de lactação (MACHADO; BICALHO, 2018).

No Brasil, o uso combinado TVS com SIT também foi eficaz na prevenção de IIM durante o PS (MARTINS et al., 2019) e na redução da CCS pós-parto (MOLINA et al., 2017). Martins et al. (2019) observaram que vacas tratadas com ciprofloxacina + SELLAT[®] apresentaram 27% menos risco de NIIM do que vacas tratadas com cefalônio + TEATSEAL[®]. Neste estudo, ambos selantes eram compostos por subnitrato de bismuto (SELLAT[®] 4g e TEATSEAL[®] 2,6g). Desta forma, os autores sugeriram que a formulação, o volume, a dosagem, e a viscosidade dos selantes poderiam influenciar na taxa de NIIM.

Após infusão intramamária, os selantes não são absorvidos sistemicamente pela GM e podem persistir no canal dos tetos por pelo menos 100 dias após a secagem (WOOLFORD et al., 1998) até que sejam fisicamente removidos na primeira ordenha ou ao longo da próxima lactação (PARKER et al., 2007) ou na primeira mamada pelo bezerro (KABERA et al., 2018). Estudo recente relatou que SIT infundido no momento da secagem estava presente em 83% dos quartos mamários na primeira ordenha após o parto (KABERA et al., 2018). Adicionalmente, Meaney (1977) utilizando raios X observou que 84% dos SITs estavam presentes nos canais dos tetos por volta de três dias antes do parto. Além disso, outro experimento do mesmo autor demonstrou que 93% dos quartos mamários mantiveram o selante no local durante todo o PS (MEANEY, 1977). Estes resultados sugerem que a barreira de proteção formada pelo selante na extremidade dos tetos pode permanecer por tempo suficiente para prevenir a ocorrência de NIIM. E, aliado a isso, o uso de técnicas radiográficas ou ultrassonográficas podem auxiliar na compreensão da dinâmica de formação, retenção e excreção dos plugues de SIT durante o PS (Figura 2; KABERA et al., 2018).

Figura 2 - Radiografia de dois tetos demonstrando a presença e a posição do selante interno de tetos

Fonte: Meaney (1977).

Apesar dos selantes não apresentaram propriedades antimicrobianas, seus resíduos no leite após o parto foram investigados. Geralmente, a maior parte do selante é removida na primeira ordenha após o parto e algumas partes residuais podem ser removidas nas ordenhas subsequentes (BHUTTO; MURRAY; WOLDEHIWET, 2011). No estudo de Kabera et al. (2018), 75% dos quartos mamários expeliram os últimos resíduos de selante cinco dias após o parto. No entanto, há relatos de resíduos de SIT no leite de 2 a 3 semanas após o parto (BERRY; HILLERTON, 2002; KABERA et al., 2018).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, segundo as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) sob o registro nº 4827260117.

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O estudo foi conduzido em cinco rebanhos leiteiros localizados nos estados de Minas Gerais (n = 3), São Paulo (n = 1) e Paraná (n = 1), com média de 570 vacas em lactação (variação de 230 a 730) e produção média de $27,5 \pm 3\text{L}/\text{vaca}/\text{dia}$. Durante a lactação as vacas foram alojadas em instalações do tipo *Free Stall* (n = 4) e *Compost Bedded Pack Barn* (n = 1). Durante o PS as vacas de todos os rebanhos permaneceram em piquetes descobertos e receberam alimentação de acordo com o manejo nutricional de cada propriedade leiteira e água *ad libitum*.

5.2 SELEÇÃO DAS VACAS

Foram selecionadas aleatoriamente vacas da raça Holandesa, Jersey e Girolando (mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) de acordo com os seguintes critérios: a) estar apta a secagem e no final de gestação (± 220 dias de prenhez), b) possuir pelo menos três quartos mamários funcionais, c) apresentar boas condições clínicas, sem afecções intercorrentes (e.g., mastite no momento da secagem ou problemas de casco) e, d) não ter sido tratada com antibióticos e/ou anti-inflamatórios 30 dias antes da secagem. O PS médio previsto foi de 60 dias com duração máxima de 100 dias.

De acordo com cálculo de determinação de tamanho amostral, baseado na taxa de NIIM durante o PS, foi necessária a inclusão de pelo menos 400 vacas com dados analisáveis, considerando nível de significância de 0,05 e poder do teste de 0,8.

5.3 COLETA DE DADOS DAS VACAS ANTES DA SECAGEM

Do total de vacas incluídas no estudo, foram registradas as seguintes informações: rebanho de origem, raça, idade, número de lactações, dias em lactação (DEL), histórico de MC, previsão de parto, número de quartos mamários funcionais e histórico de CCS dos últimos três meses antes da secagem.

5.4 CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS

As vacas selecionadas para o estudo foram aleatoriamente distribuídas em dois protocolos de secagem: TVSA – terapia de vaca seca com infusão de 0,25g de cefalônio anidro (Cepravin[®], MSD Saúde Animal) ou TVSS - TVSA associado à SIT (Masti-Seal[®], MSD Saúde Animal; Quadro 1).

Quadro 1 - Caracterização dos grupos experimentais, produtos, composição e posologia utilizados para secagem das vacas leiteiras selecionadas

Grupo experimental	Produto	Composição	VA ¹	Posologia
TVSA ²	Cepravin [®]	0,25g de cefalônio anidro	Intramamária	Uma seringa por quarto mamário
TVSS ³	Cepravin [®] + Masti-Seal [®]	Cepravin [®] (0,25g de cefalônio anidro); Masti-Seal [®] (4g de subnitrato de bismuto)	Intramamária	Uma seringa de cada produto por quarto mamário

¹VA: Via de administração do produto

²TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

³TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

Fonte: Freu (2019)

5.5.1 Terapia de vaca seca

A TVSA foi composta pela aplicação do antibiótico (0,25g de cefalônio anidro) por via intramamária no momento da secagem. Precedendo a administração do tratamento, foi realizada a ordenha completa das vacas. Em seguida, os tetos foram desinfetados com algodões embebidos em álcool 70% iodado e posteriormente secos com papel toalha descartável. Foi feita a infusão de uma seringa de antibiótico em cada teto por via intramamária, totalizando quatro seringas por vaca. Após a infusão do tratamento, os tetos foram massageados e imersos em solução desinfetante (*pós-dipping*), e a vaca teve a ordenha interrompida de forma abrupta até início da próxima lactação.

5.5.2 Terapia de vaca seca associada à SIT

O tratamento TVSS foi composto pela administração do antibiótico intramamário (0,25g de cefalônio anidro) associado ao SIT (4g de subnitrato de bismuto) no momento da secagem. Precedendo a administração do tratamento, foi realizada a ordenha completa das vacas, seguida da infusão de uma seringa de antibiótico por teto conforme descrito no item 5.5.1. Após a aplicação do antibiótico foi administrada uma seringa de selante por teto por via intramamária, totalizando quatro seringas por vaca. Não foi realizada massagem dos quartos

mamários ou do úbere das vacas após a infusão do selante. Ao final do processo, os tetos foram imersos em solução desinfetante (*pós-dipping*), e a vaca teve a ordenha interrompida de forma abrupta até início da próxima lactação.

5.5 COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE ANTES DA SECAGEM E APÓS O PARTO

5.4.1 Cultura microbiológica e contagem de células somáticas

Foram coletadas de forma asséptica amostras de leite para análise microbiológica de cada quarto mamário no dia da secagem e aos 7 ± 3 e 14 ± 3 DPP das vacas incluídas no estudo (Figura 3). Os procedimentos de coleta foram realizados segundo as recomendações do NMC (2017). Precedendo a coleta: a) os tetos foram imersos em solução desinfetante, e decorridos 30 segundos, secos com papel-toalha descartável; b) os três primeiros jatos de leite foram desprezados em caneca de fundo preto; c) a extremidade de cada teto foi desinfetada com álcool 70% iodado; d) amostras de leite foram coletadas diretamente em tubo estéril, de forma a mantê-lo inclinado para evitar riscos de contaminação; e) as amostras foram identificadas (data da coleta, nome da fazenda, número da vaca e quarto mamário coletado). Após as coletas as amostras foram mantidas refrigeradas ou congeladas até a realização da cultura microbiológica.

Figura 3 - Esquema de coleta das amostras de leite (na secagem e pós-parto) das vacas submetidas aos protocolos de secagem para análise de cultura microbiológica e de CCS

Fonte: Freu (2019)

Amostras de leite por quarto mamário para CCS foram coletadas de todas as vacas incluídas no estudo no dia da secagem e aos 14 ± 3 DPP (Figura 3). As amostras foram coletadas em frascos plásticos de 50 mL contendo conservante químico 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol®). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e encaminhadas para análise no Laboratório Clínica do Leite do Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ-USP - Piracicaba/SP). A

contagem eletrônica de células somáticas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento Somacount 300[®] (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN EUA).

5.4.2 Mastite clínica 60 DPP

Os casos de MC das vacas incluídas no estudo foram monitorados durante o PS e até o 60º dia de lactação. Os ordenhadores foram previamente treinados para identificar diariamente os quartos mamários acometidos por MC durante a rotina de ordenha de cada propriedade. O aspecto macroscópico dos três ou quatro primeiros jatos de leite de cada quarto mamário no início da ordenha foram avaliados em superfície escura para verificar alterações nas características do leite. Quartos mamários com alterações visíveis no aspecto do leite (presença de grumos, pus, coágulos, sangue ou leite aquoso) e/ou no úbere (edema, vermelhidão) foram identificados e registrados em planilhas eletrônicas contendo informações da vaca, data do caso clínico e quarto mamário acometido.

5.6 CULTURA MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite coletadas para cultura microbiológica foram analisadas seguindo as recomendações do NMC (2017). Foram inoculados 0,01 mL de leite previamente homogeneizado em placas contendo ágar sangue suplementado com 5% de sangue bovino. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e o padrão de crescimento bacteriano foi observado a cada 24 horas para avaliar as características morfológicas das colônias (número de colônias, coloração, tamanho e presença de hemólise). Amostras de leite com isolamento >2 tipos de microrganismos foram consideradas contaminadas (PARKER et al., 2008).

Testes da catalase, hidróxido de potássio (KOH), e coloração de Gram foram realizados para identificação da morfologia dos isolados em cocos ou bastonetes (HARMON, 1994a). A prova da catalase foi realizada para diferenciação dos cocos Gram-positivos em *Streptococcus* spp. (catalase negativa) e *Staphylococcus* spp. (catalase positiva). Isolados identificados como cocos catalase positivos foram submetidos ao teste de coagulase (Coagulplama, Laborclin, Brasil). A reação negativa ao teste da coagulase caracterizou os isolados em ENA, enquanto que os isolados com reação positiva no teste, com característica hemolítica em meio ágar sangue e aglutinação em látex foram considerados como *Staph. aureus*. Para isolados identificados como cocos catalase negativos foram realizadas as provas de reação de

Christie, Atkins e Munch-Petersen (CAMP), esculina, crescimento em meio bile-esculina e *Pyr-test* para diferenciação entre *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis* ou outros *Streptococcus* e *Enterococcus* spp.

A identificação de bactérias Gram-negativas (e.g., *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.) foi realizada pela inoculação de 0,01 mL de leite em ágar MacConkey. Para confirmação desses agentes foram realizadas as provas adicionais de oxidase, motilidade e gás, indol, Voges-Proskauer, urease e descarboxilação da ornitina. Colônias com morfologia de bastonetes e coloração rosa em ágar MacConkey foram identificadas como bastonetes Gram-negativos. Isolados com reação positiva ao teste de oxidase foram considerados como *Pseudomonas* spp., enquanto que os isolados oxidase-negativa tiveram uma colônia submetida ao teste Rugai Modificado (Enterex[®], Cefar Diagnóstica LTDA, Brasil) para identificação presuntiva de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp. Os bastonetes Gram-positivos foram classificados de acordo com sua micromorfologia em *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp., *Trueperella pyogenes* e *Bacillus* spp.

As amostras foram consideradas positivas para patógenos contagiosos (*Staph. aureus* e *Strep. agalactiae*) quando pelo menos uma colônia (100 ufc/mL) foi isolada no campo de estriamento da placa. Para os microrganismos ambientais (*E. coli*, estreptococos ambientais e *Klebsiella* spp.), as amostras foram consideradas positivas quando pelo menos duas colônias (≥ 200 ufc/mL) foram identificadas (DOHOO et al., 2011). As leveduras foram identificadas pelas características morfológicas em microscopia óptica (MARTINS et al., 2019).

5.7 DEFINIÇÃO DE INDICADORES DE SAÚDE DO ÚBERE

A eficácia dos protocolos de secagem (TVSA vs. TVSS) foi avaliada com base nos seguintes indicadores de saúde da GM:

5.7.1 Cura bacteriológica de IIM

Um quarto mamário foi considerado bacteriologicamente curado quando estava infectado na secagem com determinado microrganismo, mas o mesmo microrganismo não foi isolado em nenhuma das duas amostras de leite coletadas pós-tratamento (7 ± 3 e 14 ± 3 DPP).

5.7.2 Cura da mastite subclínica

Cura da MSC foi considerada quando os quartos mamários com CCS >200.000 células/mL antes da secagem tiveram redução para valores ≤ 200.000 células/mL após o parto.

5.7.3 Novos casos de mastite subclínica

Definida quando um quarto mamário apresentou CCS antes da secagem ≤ 200.000 células/mL, porém, com aumento para valores >200.000 células/mL após o parto.

5.7.4 Novas infecções intramamárias no pós-parto

As NIIM foram definidas pelo isolamento de um microrganismo nas amostras coletadas pós-parto (7 ± 3 e 14 ± 3 DPP) diferente do isolado na secagem ou pelo isolamento de qualquer microrganismo nos quartos mamários que não estavam anteriormente infectados na secagem.

De acordo com o grupo de microrganismos causadores de mastite de NIIM no pós-parto, os patógenos foram classificados em: a) patógenos maiores (*Strep. uberis*, *Staph. aureus*, *Strep. spp.*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas spp.*); b) patógenos menores (ENA e *Corynebacterium spp.*) e c) outros microrganismos (outros microrganismos Gram-positivos, outras bactérias Gram-negativas, *Enterobacter spp.*, levedura, *Enterococcus spp.* e *Bacillus spp.*).

Quando a amostra de leite apresentou dois diferentes microrganismos isolados, foi realizada a seguinte interpretação: isolamento de patógeno maior e menor considerou-se NIIM causada por patógeno maior; isolamento de *Staph. aureus* e *Streptococcus* considerou-se NIIM causada por *Staph. aureus*; e isolamento de *Corynebacterium spp.* e ENA foi considerado NIIM causada por ENA (REYHER et al., 2012).

5.7.5 Risco de mastite clínica

Foi definido pelo número de quartos mamários com MC registrado entre o dia da secagem até 60 DPP.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises descritivas para determinação da frequência dos resultados de cultura antes e após o parto foram realizadas por meio do procedimento FREQ do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para avaliação dos dados baseados na CCS, os valores foram transformados em escala logarítmica linear de CCS por meio do programa Excel (Microsoft Office, 2016), de acordo com a seguinte fórmula:

$$LS_{CCS} = \text{Log}_2 \left(\frac{CCS}{100} \right) + 3, \text{ (SCHUKKEN et al., 2003)}$$

Para as variáveis resposta denominadas como risco de cura bacteriológica na secagem, cura da MSC, novos casos de MSC e NIIM (geral e por grupo de microrganismos) foi utilizado o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Rebanho e vaca foram incluídos no modelo como. As variáveis independentes (número de lactações, DEL, PS e Log de CCS pré-secagem) foram testadas em análise univariada e apenas variáveis com $P \leq 0,30$ foram mantidas no modelo multivariado (Martins et al., 2019). O modelo final foi obtido após realização de um procedimento manual de seleção e eliminação. Potenciais confundimentos foram monitorados pelas mudanças nos coeficientes dos demais fatores do modelo, bem como os parâmetros de ajustes (AIC e -2 Log L). Quando a mudança do coeficiente do tratamento para risco de cura (bacteriológica e da MSC), novos casos de MSC e NIIM geral e por grupo de microrganismos ultrapassou 25%, a variável foi reinserida no modelo. O efeito dos tratamentos sobre as variáveis resposta foi avaliado em nível de quarto mamário usando o seguinte modelo de regressão logística com distribuição binária:

$$\begin{aligned} \text{logit}(pi) = & \beta_0 + \beta_1 \times TRAT + \beta_2 \times POS + \beta_3 \times NL(\text{covariável}) + \beta_4 \times \\ & DEL(\text{covariável}) + \beta_5 \times PS(\text{covariável}) + \beta_6 \times LSPS(\text{covariável}) + \\ & VACA(\text{aleatório}) + REB(\text{aleatório}) + e, \end{aligned}$$

em que $\text{logit}(pi)$ é a função logística para risco de cura (bacteriológica e da MSC), nova infecção ou novos casos de MSC; β_0 é o intercepto; β_1 = coeficiente de regressão para o efeito fixo do protocolo de secagem (TVSA ou TVSS); β_2 = coeficiente de regressão para efeito fixo de posição anatômica (anterior ou posterior) do quarto mamário; β_3 = coeficiente de regressão para número de lactações das vacas (incluído no modelo como covariável); β_4 = coeficiente de regressão para DEL das vacas (incluído no modelo como covariável); β_5 = coeficiente de regressão para duração do PS (incluído no modelo como covariável); β_6 = coeficiente de regressão para Log de CCS pré-secagem (incluído no modelo como

covariável); VACA = efeito aleatório de vaca; REB = efeito aleatório de rebanho; e e = erro residual.

O efeito dos protocolos de secagem sobre o risco de MC nos primeiros 60 DPP foi avaliado por meio do PROC PHREG do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). A programação COVSANDWIHCH foi utilizada para alocar os erros e utilizar uma matriz de covariância robusta e considerar a dependência do rebanho. O fim dos dias em risco foi considerado quando o quarto mamário apresentou MC. Vacas com doenças intercorrentes diferentes de mastite ou morte antes dos 60 DPP não tiveram os dados avaliados.

6 RESULTADOS

6.1 VACAS SELECIONADAS

Um total de 553 vacas atenderam os critérios de seleção e foram incluídas no estudo (270 vacas pertencentes ao grupo TVSA e 283 ao grupo TVSS). No entanto, 114 vacas (TVSA = 60; TVSS = 54) foram excluídas após admissão e não tiveram seus dados avaliados nas análises estatísticas. Os motivos de exclusão das vacas foram: a) descarte involuntário da vaca ($n = 57$), b) doenças infecciosas (e.g., metrite, retenção de placenta, pneumonia e afecções podais) que demandaram tratamento com antibiótico ($n = 48$) e c) aborto ($n = 9$). Ao final, 439 vacas (1.756 quartos mamários) tiveram dados avaliados, sendo 229 vacas (916 quartos mamários) pertencentes ao grupo TVSS e 210 vacas do grupo TVSA (840 quartos mamários).

Do total de vacas avaliadas, 420 (95,7%) foram da raça Holandesa, 13 (3,0%) Girolando (mestiças de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), e 6 (1,3%) foram da raça Jersey. A média do número de lactações no momento da secagem foi de $1,97 \pm 1,16$ partos, enquanto a média de DEL foi de $408 \pm 166,5$ dias. O PS médio das vacas foi de 57,4 dias para as vacas que receberam TVSA e 57,9 dias para as vacas que receberam TVSS (Tabela 2). A média geral de CCS dos quartos mamários de acordo com as amostras colhidas antes da secagem foi de 720.000 ± 1.456 células/mL ($\text{LogCSS} = 3,91 \pm 0,23$), e após o parto foi de $237.900 \pm 860,6$ células/mL ($\text{LogCSS} = 1,77 \pm 0,23$). Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento (TVSA vs. TVSS) na distribuição das vacas de acordo com o número de lactações, dias de PS, posição do quarto mamário e CCS pós-parto (Tabela 2). Por outro lado, houve diferença entre os grupos de tratamento para DEL ($P =$

0,0007) e CCS antes da secagem ($P = 0,0215$). Houve efeito de tempo ($P < 0,001$) e da interação tempo vs. tratamento ($P = 0,0052$) quando comparada a CCS da secagem com a CCS pós-parto (Figura 4).

Tabela 1 - Resultados descritivos das características das vacas selecionadas para o estudo (média e desvio padrão) e frequência da posição dos quartos mamários de acordo com os grupos de tratamento avaliados

Característica das vacas	Tratamento		Valor de P
	TVSA ¹	TVSS ²	
Período seco (dias)	57,4 (13,1)	57,9 (13,3)	0,4212
Número de lactações (n)	1,98 (1,25)	1,97 (1,07)	0,8418
DEL ³ (dias)	422,9 (175,1)	395,7 (157,2)	0,0007
Posição do quarto mamário, n (%)			
Anterior	420 (47,8)	458 (52,1)	0,5191
Posterior	420 (47,8)	458 (52,1)	
CCS pré-secagem (Log)	3,73 (0,23)	4,09 (0,23)	0,0215
CCS pós-parto (Log)	1,81 (0,23)	1,74 (0,22)	0,6298

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

³DEL: Dias em lactação

Fonte: Freu (2019)

Figura 4 - Resultados descritivos da CCS dos quartos mamários das amostras colhidas antes da secagem e após o parto (média e desvio padrão) de acordo com os grupos de tratamento avaliados

Probabilidades: Tratamento: $P = 0,2922$; Tempo: $P < 0,001$; Tratamento vs Tempo: $P = 0,0052$; Dias em lactação: $P = 0,0127$; Número de lactações: $P < 0,0001$

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

Fonte: Freu (2019)

6.2 FREQUÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE

6.2.1 Amostras de leite coletadas antes da secagem

Do total de amostras coletadas antes da secagem ($n = 1.756$), 1.375 (78,30%) apresentaram resultado de cultura negativa (i.e., ausência de crescimento microbiológico). Dentre as amostras com isolamento microbiano, ENA foram os patógenos mais frequentes ($n = 180$; 10,25% do total de amostras), seguidos de *Staph. aureus* ($n = 51$; 2,90%) e *Corynebacterium* spp. ($n = 30$; 1,71%). Apenas 21 amostras tiveram isolamento de bactérias Gram-negativas (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas antes da secagem de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem

Cultura microbiológica	TVSA ¹		TVSS ²		TOTAL ³	
	(N = 840)		(N = 916)		(N = 1.756)	
	N	%	N	%	N	%
Sem crescimento	657	78,21	718	78,38	1.375	78,30
Gram-positivas						
ENA ⁴	88	10,48	92	10,04	180	10,25
<i>Staph. aureus</i>	25	2,98	26	2,84	51	2,90
<i>Corynebacterium</i> spp.	8	0,95	22	2,40	30	1,71
<i>Strep. uberis</i>	12	1,43	9	0,98	21	1,20
<i>Strep. agalactiae</i>	13	1,55	7	0,76	20	1,14
<i>Strep. dysgalactiae</i>	6	0,71	5	0,55	11	0,63
<i>Streptococcus</i> spp.	5	0,60	3	0,33	8	0,46
<i>Enterococcus</i> spp.	1	0,12	0	0,00	1	0,06
Outros Gram-positivos	7	0,83	8	0,87	15	0,85
Gram-negativas						
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0,12	8	0,87	9	0,51
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,12	4	0,44	5	0,28
<i>Escherichia coli</i>	2	0,24	1	0,11	3	0,17
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,12	0	0,00	1	0,06
Outras Gram-negativas	2	0,24	1	0,11	3	0,17

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

³Um total de 23 quartos mamários (1,31%) não tiveram resultados de cultura para as amostras de leite coletadas na pré-secagem devido à ocorrência de contaminação ou a problemas no transporte até o laboratório

⁴ENA – *Staphylococcus* não-aureus

Fonte: Freu (2019)

6.2.2 Amostras de leite coletadas após o parto

Os resultados de cultura microbiológica das amostras de leite coletadas aos 7 ± 3 e 14 ± 3 dias pós-parto estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Aproximadamente 90% das amostras não tiveram crescimento microbiológico (cultura negativa). Os patógenos Gram-positivos com maior frequência de isolamento nas culturas pós-parto foram ENA, *Staph. aureus* e *Strep. uberis* e *Streptococcus* spp. Dentre os patógenos Gram-negativos, os mais prevalentes foram *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. e *E. coli*.

Tabela 3 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas aos 7 ± 3 DPP de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem

Cultura microbiológica	TVSA ¹		TVSS ²		Total ³	
	(n = 840)		(n = 916)		(n = 1.756)	
	n	%	n	%	N	%
Sem Crescimento	729	86,79	822	89,74	1551	88,33
Gram-positivas						
ENA ⁴	61	7,26	43	4,69	104	5,92
<i>Staph. aureus</i>	5	0,60	4	0,44	9	0,51
<i>Strep. uberis</i>	6	0,71	2	0,22	8	0,46
<i>Streptococcus</i> spp.	2	0,24	5	0,54	7	0,40
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	0,00	4	0,44	4	0,23
<i>Strep. dysgalactiae</i>	2	0,24	0	0,00	2	0,11
<i>Strep. agalactiae</i>	0	0,00	1	0,11	1	0,06
Outros Gram-positivos	6	0,71	4	0,44	10	0,57
Gram-negativas						
<i>Pseudomonas</i> spp.	11	1,30	8	0,87	19	1,08
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,12	5	0,54	6	0,34
<i>Escherichia coli</i>	3	0,36	2	0,22	5	0,28
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,12	0	0,00	1	0,06
Outras Gram-negativas	2	0,24	4	0,44	6	0,34
Outros						
Levedura	1	0,12	2	0,22	3	0,17

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

³Um total de 20 quartos mamários (1,14%) não tiveram resultados de cultura para as amostras coletadas aos 7 ± 3 DPP devido à ocorrência de contaminação ou a problemas no transporte até o laboratório

⁴ENA – *Staphylococcus* não-aureus

Fonte: Freu (2019)

Tabela 4 - Frequência de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas aos 14 ± 3 DPP de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem

Cultura microbiológica	TVSA ¹		TVSS ²		Total ³	
	(n = 840)		(n = 916)		(n = 1.756)	
	n	%	n	%	n	%
Sem Crescimento	714	85,00	833	90,94	1.547	88,10
Gram-positivas						
ENA ⁴	62	7,38	43	4,69	105	5,98
<i>Strep. uberis</i>	9	1,07	4	0,44	13	0,74
<i>Streptococcus</i> spp.	8	0,95	4	0,44	12	0,68
<i>Staph. aureus</i>	7	0,83	1	0,11	8	0,45
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	0,24	2	0,22	4	0,23
<i>Strep. dysgalactiae</i>	0	0,00	3	0,32	3	0,17
<i>Bacillus</i> spp.	2	0,24	1	0,11	3	0,17
<i>Enterococcus</i> spp.	3	0,36	0	0,00	3	0,17
<i>Strep. agalactiae</i>	0	0,00	1	0,11	1	0,06
Outros Gram-positivos	8	0,95	2	0,22	10	0,57
Gram-negativas						
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	1,19	3	0,32	13	0,74
<i>Enterobacter</i> spp.	0	0,00	4	0,44	4	0,23
<i>Escherichia coli</i>	3	0,36	1	0,11	4	0,23
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,12	0	0,00	1	0,06
Outras Gram-negativas	5	0,60	2	0,22	7	0,40
Outros						
Levedura	1	0,12	4	0,44	5	0,28

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos³Um total de 13 quartos mamários (0,74%) não tiveram resultados de cultura para as amostras coletadas aos 14 ± 3 DPP devido à ocorrência de contaminação ou a problemas no transporte até o laboratório⁴ENA – *Staphylococcus* não-aureus

Fonte: Freu (2019)

6.3 EFEITO DO SIT SOBRE A SAÚDE DO ÚBERE

6.3.1 Cura bacteriológica de IIM

Um total de 355 quartos mamários com isolamento de microrganismos antes da secagem foram avaliados quanto ao risco de cura bacteriológica (171 do grupo TVSA e 184 do grupo TVSS). Não houve efeito do SIT ($P = 0,09$) sobre o risco de cura bacteriológica geral, com média de 91,3% (324/355 quartos mamários), sendo que o protocolo TVSA teve cura bacteriológica de 89% e o protocolo TVSS de 95% (Figura 5, Tabela 5).

Figura 5 - Risco de cura (bacteriológica de IIM e de MSC) e de novas infecções e de MSC de acordo com os resultados de cultura e CCS de quartos mamários das vacas submetidas aos protocolos de secagem

Probabilidades: Cura bacteriológica $P = 0,09$; Cura da MSC $P = 0,40$; Novas infecções intramamárias $P = 0,007$; Novos casos de MSC $P = 0,93$

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

Fonte: Freu (2019)

Tabela 5 - Resultados do modelo de regressão logística multivariada sobre os indicadores de saúde da glândula mamária (cura bacteriológica e da MSC e novos casos de MSC) das vacas submetidas aos protocolos de secagem

Efeito	Descrição	Intercepto	EP ¹	Valor de <i>P</i>	OR ²	95% IC ³	Média	EPM ⁴	
Cura bacteriológica									
β^5		2,1926	1,0371	0,2813	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA ⁶	-0,7854	0,4641	0,0929	0,4560	0,1820	1,1420	0,8882	0,0297
	TVSS ⁷			REF				0,9457	0,0188
Posição QM ⁸	ANT ⁹	-0,7666	0,4366	0,0814	0,4650	0,1960	1,1020	0,8892	0,0262
	POST ¹⁰			REF				0,9453	0,0195
DEL ¹¹		-0,0010	0,0013	0,4138	0,9990	0,9960	1,0010	-	-
Período seco		0,0254	0,0174	0,1469	1,026	0,9910	1,0620	-	-
Cura da MSC									
β		2,3091	0,3372	0,0024	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA	-0,2183	0,2608	0,4030	0,8040	0,4820	1,3420	0,8451	0,0248
	TVSS			REF				0,8716	0,0193
DEL		-0,0009	0,0007	0,1861	0,9990	0,9980	1,0000	-	-
Nova MSC									
β		-1,4317	0,4080	0,0392	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA	-0,0217	0,2803	0,9382	0,9790	0,5640	1,6970	0,1266	0,0211
	TVSS			REF				0,1290	0,0218
DEL		-0,0012	0,0010	0,2119	0,9990	0,9970	1,0010	-	-

¹EP – Erro padrão

²OR – Odds ratio (razão de chance)

³IC – Intervalo de confiança

⁴Erro padrão da média

⁵ β - Intercepto

⁶TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

⁷TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

⁸Posição do quarto mamário

⁹Anterior

¹⁰Posterior

¹¹Dias em lactação

Fonte: Freu (2019)

O risco de cura bacteriológica de bactérias Gram-positivas foi de 91% (303/334 quartos mamários), enquanto que para bactérias Gram-negativas foi de 100% (21/21; Tabela 6). Por outro lado, a cura bacteriológica de ENA foi menor em ambos os tratamentos (TVSA = 76% de cura e TVSS = 89%).

Tabela 6 - Risco (geral e por patógeno) de cura bacteriológica de quartos mamários submetidos aos protocolos de secagem

Microrganismos	Cura bacteriológica		
	TVSA ¹	TVSS ²	Geral
Gram-positivos	87 (143/164)	94 (160/170)	91 (303/334)
ENA ¹	76 (67/88)	89 (82/92)	83 (149/180)
<i>Staph. aureus</i>	100 (25/25)	100 (26/26)	100 (51/51)
<i>Corynebacterium</i> spp.	100 (8/8)	100 (22/22)	100 (30/30)
<i>Strep. uberis</i>	100 (12/12)	100 (8/8)	100 (20/20)
<i>Strep. agalactiae</i>	100 (13/13)	100 (6/6)	100 (19/19)
<i>Strep. dysgalactiae</i>	100 (6/6)	100 (5/5)	100 (11/11)
<i>Streptococcus</i> spp.	100 (5/5)	100 (3/3)	100 (8/8)
Outros Gram-positivos	100 (7/7)	100 (8/8)	100 (15/15)
Gram-negativos	100 (7/7)	100 (14/14)	100 (21/21)
<i>Pseudomonas</i> spp.	100 (1/1)	100 (8/8)	100 (9/9)
<i>Enterobacter</i> spp.	100 (1/1)	100 (4/4)	100 (5/5)
<i>Escherichia coli</i>	100 (2/2)	100 (1/1)	100 (3/3)
<i>Klebsiella</i> spp.	100 (1/1)	-	100 (1/1)
Outras Gram-negativas	100 (2/2)	100 (1/1)	100 (3/3)

¹TVSA: Infusão de antibiótico intramamário²TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos³ENA – *Staphylococcus* não-aureus.

Fonte: Freu (2019)

6.3.2 Cura da mastite subclínica

Com base nos resultados de CCS pré-secagem e pós-parto, 882 quartos mamários foram avaliados quanto ao risco de cura da MSC (378 no grupo TVSA e 504 no grupo TVSS). Não houve efeito do uso de SIT ($P = 0,40$) sobre o risco de cura da MSC, com média geral de 85,6% (755/882 quartos mamários; Figura 5, Tabela 5).

6.3.3 Novos casos de mastite subclínica

Um total de 764 quartos mamários foram avaliados quanto ao risco de novos casos de MSC no pós-parto (399 no grupo TVSA e 365 no grupo TVSS). De forma geral, o risco de novos casos de MSC foi de 13,3% (102/764 quartos mamários). Não houve diferença estatística ($P = 0,93$) no risco de novos casos de MSC quando o protocolo de secagem TVSA (12%) foi comparado ao protocolo TVSS (13%; Figura 5, Tabela 5).

6.3.4 Nova infecção intramamária

Um total de 1.711 quartos mamários foram avaliados quanto ao risco de NIIM (824 no grupo TVSA e 887 no grupo TVSS). O risco de NIIM foi menor nas vacas tratadas com TVSS do que nas tratadas com TVSA (risco de NIIM = 14% vs. 19%, respectivamente; $P = 0,007$). Quartos mamários tratados com TVSA tiveram 1,4 vezes mais chance de apresentar NIIM que os quartos tratados com TVSS (Figura 5; Tabela 7). Além disso, o risco de NIIM foi positivamente correlacionado com a CCS pré-secagem ($P = 0,03$).

Do total de casos de NIIM, ENA foi o patógeno com maior frequência de isolamento ($n = 132$; 46,32%), seguido por *Pseudomonas* spp. ($n = 28$; 9,83%) e *Strep. uberis* ($n = 21$; 7,37%). De acordo com o grupo de microrganismos patogênicos, 34% das NIIM (98/285) foram causadas por patógenos principais (*Strep. uberis*, *Staph. aureus*, *Strep. spp.*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.), 48% (137/285) foram causadas por patógenos menores (ENA e *Corynebacterium* spp.) e 18% (50/285) causadas por outros microrganismos (outros microrganismos Gram-positivos, outras bactérias Gram-negativas, *Enterobacter* spp., Levedura, *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp.; Tabela 8).

Com base na análise de regressão logística por grupo de microrganismos patogênicos, foi observado que o protocolo TVSS reduziu em 1,8 vezes as chances de NIIM por patógenos principais em comparação com quartos mamários tratados com TVSA (Tabela 7). Não houve efeito dos protocolos de secagem na ocorrência de NIIM causadas por patógenos menores ($P = 0,54$) e outros microrganismos ($P = 0,60$).

Tabela 7 - Regressão logística para efeito dos protocolos de secagem no risco de NIIM geral e por grupo de patógenos identificados 7 ± 3 e 14 ± 3 DPP

Efeito	Descrição	Intercepto	EP ¹	Valor de <i>P</i>	OR ²	95% IC ³			Média	EPM ⁴
NIIM⁵										
β ⁶		-2,3923	0,2693	0,0030	-	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA ⁷	0,3783	0,1408	0,0073	1,4600	1,1070	1,9240	0,1865	0,0311	
	TVSS ⁸			REF				0,1358	0,0245	
Posição QM ⁹	ANT ¹⁰	0,1804	0,1393	0,1958	1,1980	0,9110	1,5740	0,1720	0,0292	
	POST ¹¹			REF				0,1478	0,0262	
Nº lactações		0,0971	0,0607	0,1098	1,1020	0,9780	1,2410	-	-	
LogCCS_PS ¹²		0,0649	0,0304	0,0332	1,0670	1,0050	1,1330	-	-	
Maior										
β		-3,8232	0,4690	0,0039	-	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA	0,6354	0,2729	0,0200	1,8880	1,1050	3,2250	0,0573	0,0211	
	TVSS			REF				0,0312	0,0123	
LogCCS_PS		0,09657	0,05291	0,0682	1,101	0,993	1,222	-	-	
Menor										
β		-2,5146	0,2361	0,0004	-	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA	-2,3124	0,2166	0,5485	1,1300	0,7570	1,6870	0,0901	0,0178	
	TVSS			REF				0,0806	0,0160	
Posição QM	ANT	0,1593	0,1825	0,3828	1,1730	0,8200	1,6780	0,0916	0,0174	
	POST			REF				0,0792	0,0156	
Outros										
β		-4,1323	0,3735	0,0004	-	-	-	-	-	-
Tratamento	TVSA	0,1569	0,3056	0,6077	1,1700	0,6420	2,1310	0,0292	0,0061	
	TVSS			REF				0,0251	0,0054	
Posição QM	ANT	0,2655	0,2904	0,3607	1,3040	0,7380	2,3050	0,0308	0,0060	
	POST			REF				0,0238	0,0052	
Nº lactações		0,1727	0,1177	0,1426	1,1880	0,9430	1,4970	-	-	

¹EP – Erro padrão²OR – Odds ratio (razão de chance)³IC – Intervalo de confiança⁴Erro padrão da média⁵NIIM – Novas infecções intramamárias⁶ β – Intercepto⁷TVSA: Infusão de antibiótico intramamário⁸TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos⁹Posição do quarto mamário¹⁰Anterior¹¹Posterior¹²Escala logarítmica de CCS na secagem

Fonte: Freu (2019)

Tabela 8 - Frequência de patógenos isolados dos casos de NIIM (considerando isolamento aos 7 ± 3 ou 14 ± 3 DPP) de acordo com os protocolos de secagem

Patógeno	NIIM ¹					
	TVSA ²		TVSS ³		Total	
	(n = 158)		(n = 127)		(n = 285)	
	n	%	n	%	n	%
Maior						
<i>Pseudomonas</i> spp.	18	11,39	10	7,87	28	9,83
<i>Strep. uberis</i>	15	9,50	6	4,72	21	7,37
<i>Staph. aureus</i>	11	6,96	5	3,94	16	5,61
<i>Streptococcus</i> spp.	8	5,06	8	6,30	16	5,61
<i>Escherichia coli</i>	5	3,16	3	2,36	8	2,81
<i>Strep. dysgalactiae</i>	2	1,27	3	2,36	5	1,75
<i>Strep. agalactiae</i>	-	-	2	1,57	2	0,70
<i>Klebsiella</i> spp.	2	1,27	-	-	2	0,70
Total	61	38,61	37	29,12	98	34,38
Menor						
ENA ⁴	71	44,94	61	48,03	132	46,32
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	5	3,94	5	1,75
Total	72	44,94	66	51,97	137	48,07
Outros						
Outros Gram-positivos	14	8,86	5	3,94	19	6,67
Outras Gram-negativas	5	3,16	5	3,94	10	3,51
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,63	8	6,30	9	3,16
Levedura	1	0,63	5	3,94	6	2,11
<i>Enterococcus</i> spp.	3	1,90	-	-	3	1,05
<i>Bacillus</i> spp.	2	1,27	1	0,79	3	1,05
Total	26	16,45	26	18,91	50	17,55

¹NIIM – Novas infecções intramamárias

²TVSA: Infusão de antibiótico intramamário

³TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos

⁴ENA – *Staphylococcus* não-aureus.

Fonte: Freu (2019)

6.3.5 Risco de mastite clínica pós-parto

Um total de 34 casos de MC em nível de quarto mamário foi registrado durante os primeiros 60 DPP e tiveram dados avaliados. Destes, 21 (61,8%) foram identificados em vacas do grupo TVSA e 13 (38,2%) em vacas do grupo TVSS. Não houve efeito do SIT sobre o risco de MC até 60 DPP, no entanto esse risco foi inversamente relacionado com o número de lactações ($P = 0,008$; Tabela 9).

Tabela 9 - Regressão logística para efeito dos protocolos de secagem no risco de MC durante os primeiros 60 DPP

Variável	Intercepto	EP ¹	HR ²	95% IC ³		Valor de P
				Mínimo	Máximo	
TVSA ⁴ (vs TVSS ⁵ , REF)	0,54151	0,33792	1,719	0,886	3,333	0,109
Posição QM ⁶ (Posterior, REF)	-0,00753	0,27957	0,992	0,574	1,717	0,978
Nº de lactações	-0,76844	0,29313	0,464	0,261	0,824	0,008

¹EP – Erro padrão²HR – Hazard ratio (razão de risco de MC)³IC – Intervalo de confiança⁴TVSA: Infusão de antibiótico intramamário⁵TVSS: Antibiótico intramamário associado à selante interno de tetos⁶Posição do quarto mamário (anterior, posterior)

Fonte: Freu (2019)

7 DISCUSSÃO

O uso combinado de TVS (cefalônio anidro, 0,25 g) com SIT (subnitrato de bismuto, 4 g) na secagem de vacas leiteiras reduziu a ocorrência de NIIM pós-parto. Resultados semelhantes foram observados por outros estudos utilizando diferentes bases antimicrobianas associadas ao SIT, tanto para vacas (cloxacilina, RUNCIMAN; MALMO; DEIGHTON, 2010; MOLINA et al., 2017), quanto para novilhas (amoxicilina; MACHADO; BICALHO, 2018).

Em nosso estudo, a TVSS reduziu em 1,4 vezes as chances de NIIM durante o PS em comparação com a TVSA. De forma semelhante, Golder, Hodge e Lean (2016) relataram que vacas tratadas apenas com antibiótico apresentaram 1,9 vezes mais chances de desenvolverem MSC do que vacas tratadas com SIT e antibiótico. Rabiee e Lean (2013) também observaram redução na ocorrência de NIIM (25%) com uso de SIT isolado ou em combinação com antibiótico na secagem de vacas leiteiras. Estes resultados sugerem que a barreira física formada pela infusão de SIT no momento da secagem reduz o risco de invasão de microrganismos na GM. Este acesso pode ser impedido devido à capacidade do selante em persistir no canal do teto durante todo PS (aproximadamente 100 dias; WOOLFORD et al., 1998), auxiliando na proteção do tecido mamário.

De acordo com o grupo de microrganismos, quartos mamários tratados com TVSA tiveram 1,8 vezes mais chance de NIIM por patógenos maiores que quartos mamários tratados com TVSS. Além disso, das NIIM causadas por patógenos maiores aproximadamente 82% (80/98) foram de origem ambiental. Estes resultados são similares aos relatados por Hogan e Smith (2003), que descreveram maiores taxas de IIM por patógenos ambientais durante o PS

em comparação com a lactação, especialmente nas duas semanas após a secagem e nas duas semanas que antecedem o parto (SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985). O maior risco de NIIM por agentes de origem ambiental pode estar atribuído à contínua produção de leite nos primeiros dias de PS, a qual favorece o acúmulo de leite na GM e ao encurtamento e dilatação do canal do teto facilitando o acesso de microrganismos oportunistas ao tecido mamário (NICKERSON, 1989; PONCHON et al., 2017), sendo que, esta condição também ocorre com o acúmulo de colostro próximo ao parto (NICKERSON, 1989).

Adicionalmente, foi reportado que vacas tratadas com SIT na secagem apresentaram menor ocorrência de IIM causadas por microrganismos ambientais (*E. coli* e enterobactérias) e outros patógenos maiores do que as vacas que receberam apenas antibiótico (HUXLEY et al., 2002). Além disso, estudo recente sugeriu que um maior volume de selante (4 g de subnitrato de bismuto, mesmo volume do SIT utilizado em nosso estudo) contribuiu com as menores chances de os quartos mamários apresentarem NIIM causada por patógenos maiores (MARTINS et al, 2019). Isto sugere que o efeito de proteção contra NIIM no PS está mais relacionado ao uso de SIT do que de antimicrobianos, uma vez que o SIT mimetiza o tampão fisiológico de queratina e impede o acesso de bactérias oportunistas à GM, especialmente as de origem ambiental (HUXLEY et al., 2002).

Em nosso estudo não houve efeito dos protocolos de secagem sobre o risco de MC até 60 DPP, semelhante ao reportado por Golder, Hodge e Lean (2016), quando avaliaram este risco após a combinação de TVS e SIT. No entanto, Godden et al. (2003) observaram que quartos mamários tratados com TVS tiveram 0,67 vezes mais risco de MC até 60 DPP em comparação com quartos mamários tratados com TVS e SIT. Adicionalmente, Rabiee e Lean (2013) relataram que a combinação de TVS e SIT reduziu em 48% o risco de MC pós-parto. Fatores como a forma de assepsia dos tetos durante os procedimentos de secagem das vacas e o ambiente que estas vacas permanecem alojadas durante o PS podem influenciar o risco de MC pós-parto (GREEN et al, 2007). Adicionalmente, em nosso estudo as vacas mais jovens apresentaram maior risco de MC até 60 DPP. Este resultado difere do reportado por Jamali et al. (2018) e Pinzon-Sanchez e Ruegg (2011), que observaram relação positiva entre número de lactações e risco de MC. Esta diferença no risco de MC pode estar atribuída à grande proporção de vacas jovens incluídas em nosso estudo. De acordo com o número de lactações na secagem, aproximadamente 46% das vacas incluídas tinham somente uma lactação, o que sugere que esta categoria de vacas esteve em maior risco de desenvolver MC durante todo período do estudo.

O risco de cura bacteriológica geral foi de 91% no presente estudo, indicando que ambos os protocolos de TVS foram eficazes no tratamento das IIM existentes. Martins et al. (2019) reportaram risco de cura semelhante (92%) para TVS com 0,25 g de cefalônio associado com SIT. Adicionalmente, na Itália e na Inglaterra, Ospina et al. (2016) e Newton et al. (2008) reportaram risco de cura de 90% e 94% com uso de 0,25 g de cefazolina + SIT e 600 mg de cloxaciclina + SIT, respectivamente. Apesar de diferentes bases antimicrobianas avaliadas na TVS por Ospina et al. (2016) e Newton et al. (2008), o risco de cura foi semelhante ao observado em nosso estudo. No entanto, comparações diretas entre estudos são limitadas devido às características das vacas selecionadas e a frequência de patógenos causadores de mastite isolados na secagem. Estas características, associadas ao estado de saúde do úbere antes da secagem e o número de lactações das vacas podem afetar o risco de cura das IIM (GUNDELACH et al., 2011).

De acordo com os resultados de regressão logística, não houve efeito do uso de SIT sobre o risco de cura da MSC e novos casos de MSC. No entanto, quando avaliados ao longo do tempo, ambos os tratamentos (TVSA e TVSS) foram eficazes em reduzir a CCS ($P = 0,0052$) após o parto. Resultados semelhantes ao nosso estudo foram descritos por McParland et al. (2019), os quais reportaram redução na CCS na lactação subsequente com TVS com cefalônio. Portanto, o uso de antibiótico em ambos os grupos de tratamento no nosso estudo pode justificar a redução de CCS pós-parto, já que os tratamentos apresentaram alta cura bacteriológica das IMI existentes.

Semelhante a estudos anteriores com TVS na América do Norte (ARRUDA et al., 2013a), Europa (OSPINA et al., 2016) e no Brasil (MOLINA et al., 2017), o patógeno mais frequentemente isolado no presente estudo foi ENA. Esta alta frequência de isolamento de ENA pode estar associada com a capacidade deste microrganismo em colonizar o canal do teto durante a lactação ou durante o PS. Além disso, o risco de isolamento de ENA pode aumentar próximo ao parto quando a concentração do antibiótico apresenta reduzida ação terapêutica na GM, permitindo a colonização da GM por este patógeno (CARNEIRO-FILHA et al., 2006; MARTINS et al., 2019). Dos microrganismos isolados na secagem, ENA apresentou a menor porcentagem de cura (83%). Este resultado é uma limitação do presente estudo, pois nenhuma identificação em nível de espécie foi realizada nestes isolados. Portanto, a informação se o isolado pós-parto é a mesma infecção ou NIIM não está clara. De acordo com Sampimon et al. (2009) a identificação de ENA em nível de espécie baseada em testes fenotípicos não é precisa, e por isso tem sido sugerida a identificação molecular destes

patógenos (ZADOKS; WATTS, 2009), no entanto, este tipo de avaliação estava além do escopo do nosso estudo.

Houve diferença entre os grupos de tratamento em relação ao DEL e Log de CCS na secagem, a despeito das vacas terem sido selecionadas de forma aleatória. Vacas que receberam TVSS apresentaram menor DEL e maior Log de CCS na secagem em comparação com vacas que receberam TVSA. Este resultado não era esperado, pois as vacas incluídas neste estudo foram aleatoriamente distribuídas entre os tratamentos. No entanto, para controlar potenciais confundimentos, foram incluídos no modelo, como covariável, os efeitos de DEL e de Log de CCS sobre as variáveis resposta avaliadas.

Outra limitação do presente estudo é a ausência de um grupo de vacas tratadas apenas com SIT Masti-Seal[®] (MSD, Saúde Animal), que poderia sugerir o uso deste composto como método alternativo para terapia seletiva de vacas secas. Embora a infusão do SIT Masti-Seal[®] associado com antibiótico reduziu a ocorrência de NIIM durante o PS e a ocorrência de MC nos primeiros 60 DPP, pesquisas adicionais que avaliem a infusão do SIT Masti-Seal[®] de forma isolada são necessárias.

8 CONCLUSÃO

O protocolo TVSS diminui as NIIM (geral e por grupo de patógenos) em comparação com TVSA, e não apresentou efeito sobre cura bacteriológica, cura da MSC, novos casos de MSC e risco de MC até 60 DPP.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, P. T. D.; BECKER, R. B. Influence of preceding dry period and of mineral supplement on lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 19, n. 4, p. 257-266, 1936.

ARRUDA, A. G. et al. Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. Quarter-level outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4419-4435, 2013a.

ARRUDA, A. G. et al. Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: II. Cow health and performance in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6390-6399, 2013b.

BACHMANN, J. et al. Residue concentration of cefquinome after intramammary dry cow therapy and short dry periods. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 7540-7550, 2018.

BAEZA, A. N. et al. Multiresidue analysis of cephalosporin antibiotics in bovine milk based on molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1474, n., p. 121-129, 2016.

BAKER, H. M.; BAKER, E. N. A structural perspective on lactoferrin function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 320-328, 2012.

BARKEMA, H. W. et al. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7426-7445, 2015.

BARTH, K. et al. Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1, p. 161-166, 2010.

BERNIER-DODIER, P. et al. Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4922-4936, 2011.

BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The effect of an intramammary teat seal on new intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2512-2520, 2002.

BHUTTO, A. L.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. The effect of dry cow therapy and internal teat-sealant on intra-mammary infections during subsequent lactation. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 2, p. 316-320, 2011.

BITMAN, J. et al. Lipid composition of bovine teat canal keratin. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 5, p. 1389-1395, 1988.

BODDIE, R. L.; NICKERSON, S. C. Dry cow therapy: effects of method of drug administration on occurrence of intramammary infection. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 1, p. 253-257, 1986.

BOLOURCHI, M.; HOVARESHTI, P.; TABATABAYI, A. H. Comparison of the effects of local and systemic dry cow therapy for staphylococcal mastitis control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 25, n. 1, p. 63-67, 1995.

BONSAGLIA, E. C. R. et al. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8067, 2017.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A. J. et al. A comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 692-704, 2011.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1957-1965, 2000.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1632-1639, 2001.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 547-568, 2004.

BURVENICH, C. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 521-564, 2003.

BUSANELLO, M. et al. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545-6553, 2017.

CAMERON, M. et al. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 270-284, 2014.

CAPUCO, A. V. et al. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2177-2187, 2001.

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M.; SMITH, J. J. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 3, p. 477-487, 1997.

CARNEIRO-FILHA, D. M. V. et al. Efeito do uso de um selante interno de tetos na profilaxia de novas infecções intramamárias durante o período seco e no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n., p. 111, 2006.

CERVINKOVA, D. et al. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinari Medicina**, v. 58, p. 567-575, 2013.

COMALLI, M. P. et al. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 11, p. 2236-2242, 1984.

CUMMINS, K. A.; MCCASKEY, T. A. Multiple infusions of cloxacillin for treatment of mastitis during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 12, p. 2658-2665, 1987.

DAMM, M. et al. Differential somatic cell count - A novel method for routine mastitis screening in the frame of dairy herd improvement testing programs. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4926-4940, 2017.

DINGWELL, R. T. et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1-2, p. 75-89, 2004.

DINGWELL, R. T.; KELTON, D. F.; LESLIE, K. E. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 235-265, 2003.

DINGWELL, R.; L. et al. The association of teat canal closure and other risk factors for new dry period intramammary infections. Annu. Mtg. National Mastitis Council. **National Mastitis Council**, Madison, WI, p. 298–299, 2003.

DOHOO, I. R. et al. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 250-261, 2011.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225-237, 1991.

DÜRR, J. W. et al. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. **Livestock Science**, v. 117, n. 2–3, p. 225-232, 2008.

EBERHART, R. J. New infections in the dry period. In: Annual Meeting of National Mastitis Council, 21., 1982, Louisville, **Proceeding**... Kentucky: NMC, 1982. p. 101-111.

FARRE, M. et al. Is dry cow therapy here to stay?. In: Annual Meeting of National Mastitis Council, 56th., 2017, Florida, **Proceeding**... Florida: NMC, 2017. p. 171-172.

FOGSGAARD, K. K.; BENNEDSGAARD, T. W.; HERSKIN, M. S. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1730-1738, 2015.

FUNKE, G.; Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 125-159, 1997.

GODDEN, S. et al. Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows when used with a dry cow intramammary antibiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3899-3911, 2003.

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, 2016.

GONÇALVES, J. L. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, n., p. 25-32, 2018.

GONÇALVES, J. L. et al. Effects of bovine subclinical mastitis caused by corynebacterium spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. **The Veterinary Journal**, v., n., p., 2015.

GOTT, P. N. et al. Intramammary infections and milk leakage following gradual or abrupt cessation of milking. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 4005-4017, 2016.

GREEN, M. J. et al. Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3764-3776, 2007.

GREEN, M. J. et al. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2589-2599, 2002.

GRUET, P. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

GUNDELACH, Y. et al. Factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 227-233, 2011.

HALASA, T. et al. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3150-3157, 2009.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994b.

HARMON, R. J. Symposium - mastitis and genetic evaluation for somatic-cell count - physiology of mastitis and factors affecting somatic-cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994a.

HENDERSON, A. C. et al. Prediction of intramammary infection status across the dry period from lifetime cow records. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5586-5595, 2016.

HERTL, J. A. et al. Does clinical mastitis in the first 100 days of lactation 1 predict increased mastitis occurrence and shorter herd life in dairy cows? **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2309-2323, 2018.

HERTL, J. A. et al. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1465-1480, 2014.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 507-519, 2003.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing environmental mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.

HUANG, Y. Q. et al. Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1, p. 499-504, 2012.

HURLEY, W. L. Mammary gland function during involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1637-1646, 1989.

HUXLEY, J. N. et al. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 551-561, 2002.

JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, 2018.

JANZEN, J. J. Economic losses resulting from mastitis. A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 9, p. 1151-1160, 1970.

JENA, M. K. et al. Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. **Developmental Biology**, v. 445, n. 2, p. 145-155, 2019.

JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 5, p. 743-747, 1981.

JOHNSON, A. P. et al. Randomized noninferiority study evaluating the efficacy of 2 commercial dry cow mastitis formulations. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 593-607, 2016.

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, 2018.

KEEFE, G. P. Streptococcus agalactiae mastitis: A review. **Canadian Veterinary Journal - Revue Veterinaire Canadienne**, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.

KITCHEN, B. J. et al. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 6, p. 978-983, 1980.

KOK, A. et al. Effect of dry period length on milk yield over multiple lactations. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 739-749, 2017.

LEE, C. S.; MCDOWELL, G. H.; LASCELLES, A. K. The importance of macrophages in the removal of fat from the involuting mammary gland. **Research in Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 1969.

LEELAHAPONGSATHON, K. et al. Comparison of transmission dynamics between Streptococcus uberis and Streptococcus agalactiae intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1418-1426, 2016.

LEELAHAPONGSATHON, K. et al. Factors in dry period associated with intramammary infection and subsequent clinical mastitis in early postpartum cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 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, 2018.

MARTINS, C. M. M. R et al. Efficacy of a drying-off protocol using ciprofloxacin combined with an internal teat sealant. In: Annual Meeting of National Mastitis Council, 56th., 2017, Florida, **Proceeding**... Florida: NMC, 2017. p. 175-176.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Noninferiority field trial for evaluation of efficacy of ciprofloxacin associated with internal teat sealant as dry-off protocol. Tropical Animal Health and Production, 2019.

MAZAL, G. et al. Effect of somatic cell count on prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 630-636, 2007.

MCDONALD, J. S.; ANDERSON, A. J. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 8, p. 1366-1368, 1981a.

MCDONALD, J. S.; ANDERSON, A. J. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the early nonlactating period. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 8, p. 1360-1365, 1981b.

MCDUGALL, S. et al. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 177-185, 2009.

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. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 63-72, 2003.

MCPARLAND, S. et al. Effect of using internal teat sealant with or without antibiotic therapy at dry-off on subsequent somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4464-4475, 2019.

MEANEY, W. J. Effect of a dry period teat seal on bovine udder infection. **Irish Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 3, p. 293-299, 1977.

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, n., p. 465-470, 2017.

MORE, S. J.; CLEGG, T. A.; MCCOY, F. The use of national-level data to describe trends in intramammary antimicrobial usage on Irish dairy farms from 2003 to 2015. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6400-6413, 2017.

MOREIRA, L. H. et al. Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, n., p. 246-251, 2018.

NAIDU, A. S. et al. Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1218-1226, 1991.

National Mastitis Council. 2017. Laboratory handbook on bovine mastitis. **National Mastitis Council**, Madison, WI, 2017.

NATZE, R. P. The role of therapy in mastitis control. In: Annual Meeting of National Mastitis Council, 21., 1982, Louisville, **Proceeding...** Kentucky: NMC, 1982. p. 125-133.

NATZKE, R. P. Therapy: One component in a mastitis control system. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 12, p. 1895-1901, 1971.

NEAVE, F. K. et al. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 5, p. 696-707, 1969.

NEWMAN, K. A et al. Lactoferrin concentrations in bovine milk prior to dry-off. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n., p. 426-432, 2009.

NEWTON, H. T. et al. Comparison of the efficacy of cloxacillin alone and cloxacillin combined with an internal teat sealant for dry-cow therapy. **Veterinary Record**, v. 162, n. 21, p. 678-684, 2008.

NICKERSON, S. C. Immunological aspects of mammary involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1665-1678, 1989.

NYMAN, A. K.; EMANUELSON, U.; WALLER, K. P. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1440-1448, 2016.

OBARA, Y.; KOMATSU, M. Relationship between N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity and cell count, lactose, chloride, or lactoferrin in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 1043-1046, 1984.

OLDHAM, E. R. et al. Changes in the bovine teat canal during the nonlactating period and early lactation, as measured by teat canal impressions. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 12, p. 2075-2079, 1991.

OLIVEIRA, C. S. et al. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 297-305, 2015.

OLIVER, S. P. et al. Influence of prepartum antibiotic therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 2, p. 406-414, 1992.

OLIVER, S. P. et al. Prepartum antibiotic treatment of heifers: milk production, milk quality and economic benefit. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1187-1193, 2003.

OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. Approaches to the manipulation of mammary involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1647-1664, 1989.

OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. Udder health in the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 9, p. 2584-2606, 1988.

O'ROURKE, D. Nutrition and udder health in dairy cows: a review. **Irish Veterinary Journal**, v. 62,, Suppl 4, p. S15-S20, 2009.

OSPINA, P. A. et al. Randomized noninferiority field trial comparing 2 first-generation cephalosporin products at dry off in quarters receiving an internal teat sealant in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6519-6531, 2016.

PAAPE, M. J. et al. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 597-627, 2003.

PANTOJA, J. C.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 139-148, 2009.

PARKER, K. I. et al. Quarter-level analysis of subclinical and clinical mastitis in primiparous heifers following the use of a teat sealant or an injectable antibiotic, or both, precalving. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 169-181, 2008.

PARKER, K. I. et al. Subclinical and clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 207-218, 2007.

PEAKER, M.; LINZELL, J. L. Citrate in milk: a harbinger of lactogenesis. **Nature**, v. 253, n. 5491, p. 464-464, 1975.

PEARSON, J. K. Further experiments in the use of penicillin in the prevention of *C. pyogenes* infection of the non-lactating bovine udder. **Veterinary Record**, v. 63, n. 12, p. 215-220, 1951.

PINZON-SANCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3397-3410, 2011.

PONCHON, B. et al. Effects of photoperiod modulation and melatonin feeding around drying-off on bovine mammary gland involution. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 8496-8506, 2017.

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, 2013.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Effect of milk cessation method at dry-off on behavioral activity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3261-3270, 2018.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 6, p. 1213-1220, 1999.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Short communication: Association between milk yield at dry-off and probability of intramammary infections at calving. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 577-579, 2005.

RATO, M. G. et al. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4542-4551, 2008.

REES, A.; FISCHER-TENHAGEN, C.; HEUWIESER, W. Udder firmness as a possible indicator for clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2170-2183, 2017.

REYHER, K. K. et al. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens-A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6483-6502, 2012.

RINDSIG, R. B. et al. Complete versus selective dry cow therapy for mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 10, p. 1483-1497, 1978.

ROBERTS, S. J. et al. Concepts and recent developments in mastitis control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 2, p. 157-166, 1969.

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

ROSSI, R. S. et al. Diagnostic accuracy of somatic cell count, california mastitis test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10220-10229, 2018.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.

RUNCIMAN, D. J.; MALMO, J.; DEIGHTON, M. The use of an internal teat sealant in combination with cloxacillin dry cow therapy for the prevention of clinical and subclinical mastitis in seasonal calving dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4582-4591, 2010.

SAMPIMON, O. C. et al. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 300-305, 2009.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da mastite e qualidade do leite – Desafios e Soluções**. Pirassununga, São Paulo, 2019. 301p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SARGEANT, J. M. et al. Sensitivity and specificity of somatic cell count and california mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SCHANBACHER, F. L.; SMITH, K. L. Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: Relation to mammary function. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 7, p. 1048-1062, 1975.

SCHERPENZEEL, C. G. M. et al. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic cell count cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3606-3614, 2014.

SCHRICK, F. N. et al. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1407-1412, 2001.

SCHUKKEN, Y. H. et al. A randomized blind trial on dry cow antibiotic infusion in a low somatic cell count herd. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2925-2930, 1993.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SCHUKKEN, Y.; GURJAR, A.; MORONI, P. Physiology and pathophysiology of the udder during the dry period. **Large Animal review**. v. 17, p. 253-259, 2011.

SHIMAZAKI, K. I.; KAWAI, K. Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 69-75, 2017.

SMITH, A. et al. Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows. **Veterinary Record**, v. 81, n. 20, p. 504-510, 1967.

SMITH, A.; DODD F. H.; NEAVE, F. K. The effect of intramammary infection during the dry period on the milk production of the affected quarter at the start of the succeeding lactation. **Journal of Dairy Research**. v. 35, p. 287, 1968.

SMITH, A.; NEAVE, F. K.; DODD, F. H. Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows. **Veterinary Record**, v. 79, n. 8, p. 233-236, 1966.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practices**, v. 9, n. 3, p. 489-498, 1993.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 2, p. 402-417, 1985.

SORDILLO, L. M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507-523, 2018.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p. 1112-1120, 1988.

SURIYASATHAPORN, W. et al. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. **Veterinary Research**, v. 31, n. 4, p. 397-412, 2000.

SWINKELS, J. M. et al. Social influences on the duration of antibiotic treatment of clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2369-2380, 2015.

SYMONS, D. B. A.; WRIGHT, L. J. Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. **Journal of Comparative Pathology**, v. 84, n. 1, p. 9-17, 1974.

TOMAZI, T. et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, n., p. 9-18, 2018.

TOMAZI, T. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1658-1663, 2014.

VAN KNEGSEL, A. T. M. et al. Effects of shortening the dry period of dairy cows on milk production, energy balance, health, and fertility: A systematic review. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 707-713, 2013.

VAN SOEST, F. J. S. et al. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8365-8374, 2016.

WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiology Review**, v. 42, n. 1, p. 45-66, 1978.

WELTY, F. K.; SMITH, K. L.; SCHANBACHER, F. L. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 2, p. 224-231, 1976.

WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; BARRINGTON, G. M. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 2, p. 259-262, 2006.

WHIST, A. C.; OSTERAS, O. Associations between somatic cell counts at calving or prior to drying-off and future somatic cell counts, in the remaining or subsequent lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 3, p. 277-287, 2006.

WILLIAMSON, J. H.; WOOLFORD, M. W.; DAY, A. M. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, n. 6, p. 228-234, 1995.

WOOLFORD, M. W. et al. The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 1, p. 12-19, 1998.

ZADOKS, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n., p., 2011.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 229-261, 2006.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 20-28, 2009.

ZEHNER, M. M. et al. Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 7, p. 1932-1941, 1986.

ZOBEL, G. et al. Gradual cessation of milking reduces milk leakage and motivation to be milked in dairy cows at dry-off. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5064-5071, 2013.