

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA REPRODUÇÃO DE
VACAS LEITEIRAS

LUCAS FURTADO DOS SANTOS PEREIRA BARBOSA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU – SP

Setembro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA REPRODUÇÃO DE
VACAS LEITEIRAS

LUCAS FURTADO DOS SANTOS PEREIRA BARBOSA

Médico Veterinário

Orientador: Prof. Ass. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU – SP

Setembro - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B238i Barbosa, Lucas Furtado dos Santos Pereira, 1986-
Impacto da mastite subclínica na reprodução de vacas leiteiras / Lucas
Furtado dos Santos Pereira Barbosa. - Botucatu : [s.n.], 2013
x , 61 f. : il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2013

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite. 2. Embrião. 3. Mastite. I. Vasconcelos, José Luiz
Moraes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Botucatu) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III.
Título.

DEDICATÓRIA

A toda minha família.

Especialmente ao meu Pai, que lá de cima me guia e me motiva e a minha Mãe que é a grande responsável por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e tranquilidade para superar desafios e conquistar vitórias.

Ao meu orientador Zequinha, pela oportunidade, confiança, amizade e ensinamentos.

A UFLA, pela minha formação em Medicina Veterinária, e ao Grupo do Leite pela formação pessoal e por todo o conhecimento envolvendo as vacas de leite.

Meus amigos de Pós-graduação Thiago Martins, Adnan Darin, Fernando Aono, Everton Rodolfo, Augusto Aboin, Tiago Leiva, Carlos Sanches, Thiago Guzella, João Pedro e Marcos Pereira, obrigado por toda ajuda e companheirismo.

Ao Adnan Darin pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Matheus Balduino e Wilson Oliveira pela ajuda na condução dos experimentos.

A Carla Gasparotto Vasconcelos, pela ajuda na análise e interpretação dos dados.

Aos membros da Conapec Jr., pelo companheirismo e auxílio na condução de experimentos.

Aos três GRANDES professores com os quais tive o imenso prazer de trabalhar e que foram os pilares da minha formação; Marcos Neves (Kiko), José Eduardo e Zequinha.

A todos os estagiários que participaram dos projetos.

A todas as fazendas que tive oportunidade de conhecer e realizar experimentos: Agrindus, São José, Colorado, Santa Rita, Santa Luzia, Brejo, Campo, Ipê, Jaraguá, Morro, Santa Isabel, Tucaninha,

Aos Veterinários, Luiz Gustavo e Álex da fazenda Bela Vista pela ajuda na condução de experimentos.

A todos os funcionários e moradores das fazendas envolvidas, principalmente os da São José que foram grandes companheiros neste longo período que fiquei por lá.

Aos membros da banca de qualificação, Marcos Veiga e Hélio Langoni, meu agradecimento pelas sugestões e críticas que contribuíram para melhoria da dissertação.

Aos membros da banca examinadora, José Carlos de Figueiredo Pantoja e Leane Oliveira.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa fornecida.

Ao meu pai, minha mãe, Vó e Irmã pelo carinho e apoio incondicional.

Aos meus amigos, familiares e todos que de alguma maneira participaram desta caminhada.

Muito obrigado a todos!

“Escolha um trabalho que ama e não terá que trabalhar um único dia em sua vida.”

(Confúcio)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
SUMÁRIO DE TABELAS	x
SUMÁRIO DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1	12
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Mastite	15
2.2. CCS	15
2.3. Tipos de mastite e agentes causadores	16
2.3.1. SCN	16
2.3.2. Contagiosos	17
2.3.3. Ambientais	17
2.4. Relação entre CCS e isolamento de agentes causadores de mastite	18
2.5. Problemas reprodutivos e diminuição da fertilidade	18
2.6. Relação entre mastite e reprodução	19
2.7. Possíveis mecanismos de ação da mastite sobre a fertilidade	21
2.8. Vantagens da utilização da transferência de embriões	23
3.1. REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2	34
RELAÇÃO ENTRE CCS E INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E IMPACTO NA P/TE DE VACAS EM LACTAÇÃO	34
RESUMO	35
ABSTRACT	37
1. Introdução.....	39
2. Material e Métodos	40
2.1. Animais, instalações e tratamentos.....	40
2.1.1. Experimento 1	40
2.1.2. Experimento 2	41

2.2.	Coleta de amostras para cultura microbiológica e CCS	42
2.3.	Cultura microbiológica	42
2.4.	Classificação das bactérias	43
2.6.	Diagnóstico de gestação	44
2.7.	Análise estatística	44
3.	Resultados	45
3.1.	Experimento 1	45
3.2.	Experimento 2	48
4.	Discussão	51
5.	Conclusão	54
6.	Referências	55
CAPÍTULO 3		61
CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES		61

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS – Contagem de Células Somáticas

Céls./ml – Células por Mililitro

CL – Corpo Lúteo

DG – Diagnóstico de Gestação

DEL – Dias em Lactação

EUA – Estado Unidos da América

FIV – Fertilização *In Vitro*

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IA – Inseminação Artificial

IEP – Intervalo Entre Partos

IIM – Infecção Intramamária

IL – Interleucina

IM – Intramuscular

Kg - Kilograma

LH – Hormônio Luteinizante

LPS – Lipopolissacarídeo

NMC – “National Mastitis Council” (Conselho Nacional de Mastite)

ON – Óxido Nítrico

P/IA – Prenhez por IA

P/TE – Prenhez por TE

PGE – Prostaglandina E

PGF –Prostaglandina F

Se. - Sensibilidade

SNC – Estafilococos Coagulase Negativa

Sp. - Especificidade

TE – Transferência de Embrião

TETF – Transferência de Embrião em Tempo Fixo

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1.....	45
Prevalência de patógenos causadores de mastite nas oito fazendas do Experimento 1.	
Tabela 2.....	46
Sensibilidade (Se.) e Especificidade (Sp.) de todas as amostras e divida por grupo de bactérias para diferentes valores de CCS.	
Tabela 3.....	47
Sensibilidade (Se.) e Especificidade (Sp.) por grupo de bactérias para diferentes valores de CCS.	
Tabela 4.....	47
Número de animais, produção de leite, dias em lactação (DEL), número de serviços e ordem de lactação por grupo de bactérias.	
Tabela 5.....	48
Prevalência de patógenos causadores de mastite (Experimento 2).	
Tabela 6.....	49
Efeito do isolamento de agentes causadores de mastite subclínica nas taxas de prenhez e perda de gestação.	
Tabela 7.....	49
Efeito do isolamento de agentes principais ou secundários nas taxas de prenhez e perda de gestação.	

SUMÁRIO DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1.....	41
---------------	----

Diagrama esquemático do experimento 2. **D-11:** aplicação de 2mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do CIDR; **D-4:** aplicação de 25mg de Dinoprost; **D-2:** retirada do CIDR e aplicação de 1mg de ECP (Cipionato de Estradiol); **D5:** mensuração da produção e coleta de amostras de leite para análise de CCS e cultura microbiológica; **D7:** avaliação ultrassonográfica dos ovários para detecção de CL, e TE nos animais com CL; **D31:** primeiro diagnóstico de gestação; **D66:** segundo diagnóstico de gestação.

Figura 2.....	50
---------------	----

P/TE de acordo com a CCS. Os animais foram divididos em três classes de CCS: 1) < 200.000 céls./ml n=716, 2) de 200.000 a 400.000 céls./ml n= 134 e 3) mais que 400.000 céls./ml n=247.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 23 milhões de vacas leiteiras e no ano de 2011 produziu 32 bilhões de litros de leite, sendo considerado o quarto maior produtor mundial, mas a produção média de leite por vaca é baixa, 1.381 litros/vaca/ano (FAOSTAT, 2011). O baixo potencial genético (ANUALPEC, 2011), o estresse térmico (RHOADS et al., 2009) e a alta prevalência de doenças infecciosas (Pereira et al., 2013) são limitantes para aumentar a produção de leite no Brasil.

A rentabilidade da atividade leiteira depende da produtividade dos animais e a medida que aumenta o intervalo entre partos (IEP) menor é a produtividade. Vacas em lactação apresentam menores taxas de concepção e maiores perdas de gestação (LUCY, 2001), sendo associadas a diversos fatores, como o aumento da produção de leite (BUTTLER & SMITH, 1989), nutrição (LUCY, 2001), estresse térmico (DEMETRIO & VASCONCELOS, 2011), mastite (SANTOS et al., 2004) e outras doenças infecciosas (Pereira et al., 2013).

A mastite é uma das infecções mais comuns nos rebanhos leiteiros do mundo todo, com incidência ao redor de 50 a 70 casos por 100 vacas/ano no Reino Unido (BRADLEY et al., 2007). Smith & Hogan (2001), estimaram que o custo da mastite para a indústria leiteira dos Estados Unidos é ao redor de dois bilhões de dólares por ano ou 11% de toda a produção de leite do país. Segundo estes autores os maiores custos são atribuídos a redução na produção e descarte de leite e reposição de animais, que respectivamente são: \$102, \$24, e \$33 por vaca/ano. Os custos com trabalho, medicamentos e serviços veterinários são relativamente baixos, ficando ao redor de \$13 por vaca/ano. O custo total da mastite é em média 172 dólares por vaca/ano.

A mastite está amplamente difundida no Brasil, em levantamento feito pelo laboratório VidaVet, foram isolados agentes causadores de mastite em aproximadamente 70% das 118 mil amostras analisadas (COMUNICAÇÃO PESSOAL). Um dos motivos desta alta prevalência é a baixa exigência e fiscalização do governo e da população quanto a qualidade do leite. O governo brasileiro, tendo como base a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL 2011) em vigor, exige que a contagem de células somáticas (CCS) média do rebanho esteja abaixo de 600.000 céls./ml. Com estes valores de CCS é possível que grande parte dos animais apresente algum grau de mastite, segundo Chebel (2007), vacas com CCS acima de 200.000

céls./ml, mesmo sem nenhum sinal adicional, já são classificados como portadoras de mastite subclínica. Nos resultados do presente estudo observou-se isolamento de agentes causadores de mastite em aproximadamente 60% das amostras de leite com CCS menor que 600.000 céls./ml. No Brasil, 23% das fazendas não atendem a normativa em vigor e produzem leite com CCS acima do padrão exigido, estes rebanhos são responsáveis por 26% da produção total de leite do Brasil (CASSOLI, 2013). A legislação nos EUA exige que a CCS média do rebanho esteja abaixo de 750.000 céls./ml, apesar da exigência ser menor que no Brasil, a média nacional de 2012 foi de 200.000 céls./ml. Apenas 3,3% dos rebanhos possuem CCS média maior que 600.000 céls./ml e somente 1,5% dos rebanhos leiteiros norte americanos estavam fora dos padrões exigidos por lei (NORMAN et al., 2012).

Diversos estudos encontraram associação entre mastite e reprodução (SCHRICK et al., 2001; HANSEN et al., 2004; SANTOS et al., 2004; MOORE et al., 2005;). Chebel et al. (2004) relataram que vacas que apresentaram mastite entre a IA e a confirmação da gestação (45 d) tiveram 2,8 vezes mais chances de perder a gestação entre 31 e 45 d. A mastite subclínica ou CCS elevada sem sinais clínicos também tem impacto negativo na performance reprodutiva (Hudson et al., 2012). Vacas apresentando CCS maior que 300.000 céls./ml no último teste antes da IA apresentaram maior perda embrionária (30% vs. 12,5%) entre 28 e 40 dias que vacas com CCS menor que 300.000 céls./ml (MOORE et al., 2005). Segundo Philpot & Nickerson (1991), para cada caso clínico de mastite podem existir de 15 a 40 casos subclínicos.

Os mecanismos pelos quais a mastite subclínica pode afetar a fertilidade de vacas leiteiras ainda não estão bem elucidados. A utilização da Transferência de Embriões (TE) pode ser um modelo interessante para entender estes mecanismos, já que a TE é feita apenas com embriões que já passaram por períodos críticos como o desenvolvimento oocitário e o desenvolvimento embrionário inicial (EALY et al., 1993).

Os objetivos destes estudos foram (1) determinar a Se. e Sp. de diferentes limiares de CCS para identificar mastite subclínica; (2) verificar o impacto do isolamento de bactérias causadoras de mastite e da CCS durante protocolo de TETF na P/TE de vacas em lactação. A hipótese destes estudos é que infecção intramamária

(IIM) está associada a aumento de CCS e que ambos afetam negativamente a P/TE de vacas em lactação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

De acordo com o NMC (Conselho Nacional de Mastite, 1996), a mastite é uma inflamação da glândula mamária com o propósito de destruir ou neutralizar o agente causador e preparar o tecido para a cura e recuperação da função normal. A mastite pode ser causada por diversos tipos de agentes, entre eles estão os infecciosos e suas toxinas, trauma físico e substâncias químicas irritantes. Em bovinos leiteiros a principal causa da mastite são os microrganismos, principalmente bactérias, que invadem o úbere, se multiplicam nos tecidos produtores de leite e produzem toxinas que causam lesão.

2.2. CCS

A contagem de células somáticas do leite é um critério de qualidade mundialmente utilizado por indústrias, produtores e entidades governamentais. A CCS é composta por células epiteliais da glândula mamária e por um conjunto de células de origem sanguínea (leucócitos) cuja função é a defesa da glândula. As células somáticas indicam a ocorrência de inflamação intramamária, a CCS da glândula saudável não passa das 200.000 céls./ml, valores acima disto são indicativos de mastite subclínica (Santos & Fonseca 2007).

Órgãos fiscalizadores e governos de vários países se baseiam nos valores de CCS para exigir qualidade do leite para os produtores. O limite máximo legal para União Europeia, Nova Zelândia e Austrália é de 400.000 céls./ml (SARGEANT et al., 1998). No Canadá, Brasil e EUA, os limites estabelecidos por lei são respectivamente, 500.000, 600.000 e 750.000 céls./ml (SARGEANT et al., 1998 ; BRASIL 2011).

A avaliação da mastite subclínica e qualidade do leite pela CCS pode apresentar algumas limitações. A utilização da CCS como estimativa da saúde da glândula mamária é mais aplicável a rebanhos com maior prevalência de patógenos contagiosos.

A infecção por patógenos ambientais em geral não eleva os valores de CCS a níveis semelhantes a infecções por patógenos contagiosos (NMC, 1999), desta maneira, muitas infecções podem não ser detectadas quando se avalia apenas este parâmetro (NMC, 1998). Mesmo após o fim da IIM a CCS ainda se mantém alta por um período de tempo, podendo gerar falsos positivos, vacas com mais dias em lactação também apresentam maior CCS (Schepers et al., 1997).

2.3. Tipos de mastite e agentes causadores

A mastite pode ser dividida quanto a sua forma de manifestação em clínica ou subclínica. A mastite subclínica não apresenta sinais visíveis de inflamação ou anormalidades no leite, entretanto, a presença de microrganismos, pode ser detectada por cultura microbiológica e a inflamação pode ser diagnosticada por teste de condutividade ou CCS (NMC 1996). Na mastite clínica existem sinais evidentes e podem ser notados os sinais clássicos da inflamação: dor, vermelhidão e inchaço além de mudanças macroscópicas no leite, como a presença de grumos ou pus. Além disso, na mastite clínica, sinais sistêmicos como, febre, diminuição do consumo e desidratação podem estar presentes (Santos & Fonseca, 2007).

Outra forma de classificação é pelas características do agente causador da mastite. Desta maneira, a mastite é dividida em ambiental ou contagiosa. Alguns agentes não se encaixam nesta classificação, é o caso dos estafilococos coagulase negativo (SCN), que são considerados agentes secundários. Os fungos, leveduras e algas também são microrganismos causadores de IIM (NMC, 1999). As três principais classes de agentes, segundo o NMC, estão detalhadas abaixo:

2.3.1. SCN

Os SCN são os microrganismos mais frequentemente isolados em amostras de leite de bovinos, isto ocorre pois estes são habitantes naturais da pele do úbere e podem colonizar o canal do teto sem causar mastite, não sendo classificadas nem como contagiosas nem como ambientais (NMC, 1999). Os SCN são de baixa patogenicidade, normalmente, gerando apenas mastite subclínica com aumento na CCS de duas ou três

vezes a quantidade da glândula não infectada. Ocasionalmente podem causar mastite clínica (isolado positivo e CCS alta), porém dificilmente como patógeno principal, normalmente são secundários (NMC, 1999).

2.3.2. Contagiosos

Estes agentes são transmitidos normalmente de vaca para vaca. Dentro de uma fazenda, a principal fonte de contaminação é a glândula mamária de animais infectados e esta ocorre de forma geral, durante a ordenha. Leite dos quartos infectados podem contaminar as máquinas de ordenha e mãos do ordenhador, que posteriormente podem entrar em contato com outros animais, transmitindo a infecção (Santos & Fonseca, 2007).

Os principais patógenos contagiosos são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, todos estes gram positivos. O controle da transmissão dessas bactérias deve ser concentrado principalmente durante o período de ordenha. Higienização do úbere, cuidados na colocação e retirada das teteiras e pós dipping são essenciais para o controle de agentes contagiosos (Santos & Fonseca, 2007).

2.3.3. Ambientais

Estes agentes são transmitidos do ambiente para o animal. A principal fonte dentro de uma fazenda é o habitat da vaca (solo, cama, esterco, água). A contaminação das vacas ocorre normalmente no intervalo entre as ordenhas, mas pode ocorrer também durante a ordenha, principalmente quando há mal funcionamento do equipamento (Santos & Fonseca, 2007).

Os patógenos ambientais podem ser divididos em gram-positivos (*Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*) e gram-negativos (*Citrobacter freundii* Coliformes, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*). A manutenção das camas e do ambiente limpos e secos e a utilização do pré dipping são os principais fatores para evitar a contaminação por patógenos ambientais (Santos & Fonseca, 2007).

2.4. Relação entre CCS e isolamento de agentes causadores de mastite

A CCS é o critério mais utilizado para controle e monitoramento da mastite nos rebanhos leiteiros, sendo utilizada por diversos autores como indicativo de mastite subclínica, vacas com CCS acima de um limiar pré estabelecido são consideradas portadoras de mastite subclínica (PINEDO et al., 2009; LAVON et al., 2011; HUDSON et al., 2012). A avaliação da saúde da glândula mamária baseada apenas na CCS pode ter algumas limitações. Dohoo & Leslie (1991) relacionando CCS e isolamento de agentes causadores de mastite, encontram sensibilidade (Se.) de 83,4% e especificidade (Sp.) de 58,9% utilizando CCS de 200.000 céls./ml como limiar. Neste estudo foram avaliados apenas os patógenos considerados principais. Já Schepers et al., (1997) utilizando o mesmo limiar encontraram Se. de 74,5% e Sp. de 89,6%. Reis et al., (2011) encontraram Se. ainda mais baixa, 51,5%, ou seja 48,5% de falso-negativos, estes animais podem ser o gargalo num programa de controle da doença já que podem ser a fonte de contaminação do restante do rebanho.

2.5. Problemas reprodutivos e diminuição da fertilidade

Diversos estudos mostraram redução na eficiência reprodutiva associada a incremento no mérito genético para produção de leite (BUTLER, 1998; LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002). Esta redução ocorre tanto em sistemas de vacas de alta produção e dieta completa, típico dos EUA e Canadá, quanto em sistemas baseados em pasto e vacas de menor produção, típico da Nova Zelândia (HARRIS & KOLVER, 2001; LUCY, 2003). Algumas das possíveis causas para este declínio na eficiência reprodutiva podem ser: reduzida circulação de hormônios esteroides (VASCONCELOS et al., 1999); baixa qualidade oocitária e falhas no desenvolvimento embrionário inicial (SARTORI et al., 2002a); estresse térmico (VASCONCELOS et al., 2011; VASCONCELOS & DEMETRIO, 2011); além das doenças infecciosas como a mastite (SCHRICK et al., 2001; HANSEN et al., 2004; SANTOS et al., 2004).

A sanidade tem grande impacto na fertilidade do rebanho (LUCY 2001). A mudança dos animais para sistemas de produção intensiva de leite aumentaram o risco

de IIM e uterinas (GOLDBERG et al., 1992; KANEENE & MILLER, 1994) e estas duas doenças são fatores de risco para a fertilidade de vacas leiteiras (Le BLANC et al., 2002; HANSEN et al., 2004).

Protocolos hormonais têm sido utilizados para inseminar vacas sem a detecção de cio para aumentar a taxa de serviço (VASCONCELOS et al., 1999; PURSLEY et al., 1995). Diversos estudos já foram conduzidos testando diferentes protocolos, com diferentes hormônios e dias de aplicação com o intuito de aumentar as taxas de concepção. Apesar da grande quantidade de estudos, a Prenhez por Inseminação Artificial (P/IA) está ao redor de 30% a 45% na maioria deles e, diferenças acima de dez pontos percentuais entre dois protocolos em um mesmo estudo, não são comumente encontradas (LIMA et al., 2009; CHEBEL et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Isto sugere que o problema talvez não esteja apenas nos protocolos de sincronização. A alta prevalência de doenças infecciosas (metrite, mastite, IBR, BVD e etc) talvez seja fator determinante para a baixa P/IA nos rebanhos leiteiros em geral (LE BLANC et al., 2002; SANTOS et al., 2004; Pereira et al., 2013) .

A eficiência reprodutiva desempenha papel crucial na cadeia produtiva de leite com impacto direto na rentabilidade de uma fazenda. Tenhagen et al., (2004) estimaram que cada dia aberto (acima de 85 dias pós parto) custa ao redor de 6,00 reais vaca/dia, além disso, rebanhos que apresentam baixa fertilidade apresentam maior taxa de descarte e são perdidos 1.625,00 reais por vaca descartada, na Europa.

2.6. Relação entre mastite e reprodução

Os custos associados a mastite são diversos, incluindo, redução na produção e qualidade do leite, aumento da taxa de descarte, entre outros (SMITH & HOGAN, 2001). Outro fator importante, é a redução da fertilidade. Apesar de ainda não ter sido estabelecido efeito direto da mastite na eficiência reprodutiva, existe relação entre saúde da glândula mamária e baixa fertilidade em vacas leiteiras (CHEBEL, 2007).

Diversos estudos relataram os efeitos deletérios da mastite na fertilidade de vacas leiteiras (SCHRICK et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HERTL et al., 2010). Barker et al., (1998) mostraram declínio da fertilidade nos animais que apresentaram mastite clínica. O impacto em cada parâmetro reprodutivo depende do período que o

animal apresenta a doença, vacas com mastite antes da primeira Inseminação Artificial (IA), tiveram seu primeiro serviço atrasado em aproximadamente 20 dias e animais com mastite após a primeira IA apresentaram maior número de inseminações por concepção (2.9 vs. 1.7). Aumento do intervalo parto - primeira IA em vacas com mastite clínica também foi descrito por Wilson et al., (2008). Hertl et al., (2010) observaram que o impacto da mastite na reprodução depende do momento que o caso clínico ocorre. Independente do agente envolvido, se a mastite aconteceu entre 15 dias antes da IA e 36 dias depois, houve diminuição na probabilidade de concepção, o maior impacto foi observado quando o caso clínico ocorreu de 0 a 7 dias após a IA (HERTL et al., 2010). Santos et al., (2004) observaram redução de 64% na concepção em vacas que apresentaram mastite subclínica entre a IA e o Diagnóstico de Gestação (DG).

McDougall et al., (2005) avaliaram a performance reprodutiva de 2.004 vacas leiteiras em 10 propriedades da Nova Zelândia. Vacas que apresentaram mastite clínica em qualquer fase da lactação foram 1,57 vezes mais propensas a perder a gestação que vacas sadias. Do mesmo modo, em estudo de Risco et al., (1999) animais que apresentaram mastite clínica nos primeiros 45 dias de gestação tiveram 2,7 vezes mais risco de aborto nos próximos 90 dias.

Mesmo na forma subclínica a mastite pode causar redução na fertilidade (HUDSON et al., 2012). Schrick et al., (2001) mostraram que a mastite subclínica reduziu o desempenho reprodutivo de forma similar à mastite clínica. Independentemente da forma da doença, o intervalo parto - primeira IA, dias aberto e serviços por concepção foram maiores para animais com mastite que para animais saudáveis. Vacas com CCS maior que 300.000 céls./ml apresentaram intervalo parto-primeira IA aumentado em 21,8 d, dias em aberto maior em 48,7 d e 0,49 mais serviços por concepção que vacas com CCS menor que 300.000 céls./ml (PINEDO et al., 2009). Moore et al., (2005) também relataram a importância da mastite subclínica, vacas com CCS maior que 300.000 céls./ml antes da IA foram 2,4 vezes mais propensas a perder a gestação entre o d 28 e d 40 que vacas com CCS menor que 300.000 céls/ml (30% vs. 12,5%). Lavon et al., (2011) observaram que CCS ainda mais baixa impacta na fertilidade. Em levantamento de aproximadamente 290.000 animais, estes autores relataram queda de, aproximadamente, 10 pontos percentuais na P/IA de animais com CCS acima de 150.000 céls./ml ao redor da primeira IA pós parto.

Além da forma de manifestação (clínica ou subclínica), outro fator discutido é se o impacto na fertilidade é gerado em decorrência da mastite causada por agentes gram-positivos ou agentes gram-negativos. Alguns autores (SOTO et al., 2003; HANSEN et al., 2004) relatam que os distúrbios na fertilidade são desencadeados principalmente pelo LPS, desta maneira, a mastite causada por bactérias gram-negativas seria a mais importante já que o LPS é um lipopolissacarídeo exclusivo destes agentes. Hertl et al., (2010) observaram que os dois tipos impactam na fertilidade, porém quando se tem a presença de bactérias gram-negativas, os efeitos são mais pronunciados. Hockett et al., (2000) e Hockett et al., (2005) trabalhando com bactérias gram-positivas para induzir mastite em vacas leiteiras, observaram menor manifestação de estro, menor pulsatilidade de LH e menor produção de estradiol 17β . Baker et al., (1998), Schrinck et al., (2001) e Santos et al., (2004) observaram que independentemente do tipo de bactéria isolada a mastite gerou redução da fertilidade. Desta maneira, observa-se que as duas classes de bactérias são capazes de causar distúrbios fisiológicos que podem gerar falhas reprodutivas em vacas leiteiras.

2.7. Possíveis mecanismos de ação da mastite sobre a fertilidade

Os mecanismos pelos quais a mastite pode afetar a performance reprodutiva de vacas leiteiras ainda não são totalmente conhecidos. A mastite pode causar uma série de alterações clínicas: febre, aumento da permeabilidade vascular local, aumento da contagem de leucócitos no sangue, maior frequência cardíaca e respiratória, além de desencadear processos inflamatórios (SOTO et al., 2003; HANSEN et al., 2004). Animais com mastite também tiveram aumento nas concentrações séricas de cortisol (HOCKETT et al., 2000).

O aumento da temperatura corporal causado pela mastite pode comprometer alguns processos reprodutivos. Estudos mostram o impacto da alta temperatura corporal na fertilidade de vacas leiteiras (VASCONCELOS et al., 2011; VASCONCELOS & DEMETRIO, 2011). Em vacas, o estresse térmico durante a maturação oocitária (PUTNEY et al., 1988) ou desenvolvimento embrionário inicial (EALY et al., 1993) leva a menor taxa de sobrevivência embrionária.

A mastite desencadeia a produção de uma série de moléculas bioativas que, potencialmente, podem prejudicar os tecidos do trato reprodutivo (HANSEN et al., 2004). Em vacas com mastite podem ser encontrados níveis aumentados de Interleucina (IL) 1a e b, IL 10 e 12, fator de necrose tumoral- α (TNF α) (RIOLLET et al., 2001), óxido nítrico (ON) (BLUM et al., 2000) e prostaglandina F2 α (PGF2 α) (GIRI et al., 1984). Dentre estas moléculas o TNF α , o ON e a PGF2 α podem afetar a fertilidade, agindo no oócito ou no embrião (HANSEN et al., 2004). Soto et al., (2003) demonstraram que o LPS, presente na membrana das bactérias gram-negativas, também pode causar efeitos deletérios. A adição de LPS ou PGF2 α a um meio de maturação oocitária reduziu a proporção de oócitos que se tornaram blastocistos no d 8. Quando adicionado após a fertilização estes efeitos não foram observados. Ao contrário, quando se adicionou um precursor de ON, nitroprussiato de sódio (SNP), não houve efeito durante maturação oocitária e sim após a fertilização. Estas moléculas causam danos tanto no oócito (LPS e PGF2 α) quanto no desenvolvimento embrionário (ON) (SOTO et al., 2003). Neste estudo a concentração de LPS que gerou efeitos negativos durante a maturação oocitária foi de 1 ng/ml ou mais. Estas concentrações são muito mais altas que as encontradas em vacas com mastite induzida por *E. coli* (55 a 134 pg/ml) (Dosogne et al., 2002). Por outro lado, o LPS é também precursor de diversas citocinas (IL-1 β , IL-8 e TNF α) e pode ter seus efeitos mediados por estas (HANSEN et al., 2004). Sendo assim, o efeito do LPS sobre a fertilidade de vacas leiteiras ainda precisa ser investigado.

Os efeitos do LPS sobre a fertilidade foram descritos acima, porém este é um polissacarídeo exclusivo da membrana de bactérias gram-negativas (HANSEN et al., 2004). As bactérias gram-positivas possuem outro componente de membrana, o ácido lipoteicóico ou ácido teicóico (ALT), que pode afetar a fertilidade de maneira semelhante (KAJIKAWA et al., 1998).

A mastite pode afetar a produção e liberação de hormônios reprodutivos. Bataglia et al., (1997) relataram menor secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em ovelhas. Menor manifestação de estro (HOCKETT et al., 2000), interrupção do crescimento folicular (Herath et al., 2007) menor pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH) e produção de estradiol 17 β (HOCKETT et al., 2005) foram observados em vacas com mastite clínica. Vacas com mastite na forma aguda não

apresentaram pico de LH e conseqüentemente não houve ovulação (HOCKETT et al., 2005), infusão intra uterina de LPS também resultou em baixa taxa de ovulação (WILLIAMS et al., 2008). No mesmo sentido, Herath et al., (2007) associaram LPS proveniente da *E. coli* a mudança na produção de PGF2 α para PGE2 α , resultando em uma fase luteal prolongada que potencialmente diminui a probabilidade de ovulação e concepção. Por outro lado, a mastite pode desencadear uma cascata inflamatória e conseqüente aumento na produção de PGF2 α , que pela lise do corpo lúteo (CL) pode impedir a manutenção da gestação (HANSEN et., 2004).

2.8. Vantagens da utilização da transferência de embriões

Apesar de Sartori et al., (2006) não terem encontrado diferenças na taxa de concepção de vacas recebendo IA ou TE, outros autores relataram que as taxas de prenhez são aumentadas quando se utiliza a TE (DROST et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2011). Demetrio et al. (2007), demonstraram aumento na taxa de concepção no d 28 (IA, 37,9% vs. TE, 59,4%) e no d 42 (IA, 33,8% vs. TE, 46,6%).

A utilização da TE permite que sejam usados somente embriões competentes no d 7 após a ovulação. Estes embriões já passaram pelo período mais crítico do desenvolvimento (1 a 3 d após a fertilização; EALY et al., 1993). O uso da TE pode minimizar os desafios da baixa qualidade oocitária, falhas no desenvolvimento inicial embrionário e baixa tolerância ao calor da vaca leiteira (VASCONCELOS et al., 2011).

Apesar de estudos relatarem impacto negativo da mastite na performance reprodutiva de rebanhos leiteiros (SCHRICK et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HERTL et al., 2010), ainda não está totalmente elucidado por quais mecanismos isto ocorre. A utilização do embrião como modelo experimental é válida para entender os possíveis mecanismos, já que efeitos na qualidade oocitária, falhas na ovulação e outros desafios que ocorrem antes do d 7 não seriam explicações para a redução da fertilidade em receptoras de embrião com mastite.

A hipótese destes estudos é que IIM está associada a aumento de CCS e que ambos afetam negativamente a P/TE de vacas em lactação.

No capítulo 2 é apresentado o trabalho: “Relação entre CCS e crescimento bacteriano e impacto na P/TE de vacas em lactação”.

Pretende-se publicar no Journal of Dairy Science.

3.1. REFERÊNCIAS

ANUALPEC 2011. Anuário da Pecuária Brasileira, 2011, Instituto FNP, São Paulo

BARKER, A. R., F. N. SCHRICK, M. J. LEWIS, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1285–1290, 1998.

BATTAGLIA, D.F., J.M. BOWEN, H.K. KRASA, L.A. THRUN, C. VIGUIE', F.J. KARSCH. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood. *Endocrinology*, v. 138, p. 4273–4281, 1997.

BLUM J.W., H. DOSOGNE, D. HOEBEN, F. VANGROENWEGHE, H.M. HAMMON, R.M. BRUCKMAIER, C. BURVENICH. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 19, p. 223–235, 2000.

BRADLEY, A. J., K. A. LEACH, J. E. BREEN, L. E. GREEN, M. J. GREEN. Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, v. 160, p. 253–257, 2007.

BUTLER, W. R. 1998. Influence of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2533–2539 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

CASSOLI, L. D. A qualidade do leite sob uma nova perspectiva: Produtores vs. Volume de leite. *Revista Leite Integral*, v. 50, p. 56-58, 2013.

CHAGAS L.M., J.J. BASS, D. BLACHE, C.R. BURKE, J.K. KAY, D.R. LINDSAY, M.C. LUCY, G.B. MARTIN, S. MEIER, F.M. RHODES, J.R. ROCHE, W.W. THATCHER, R. WEBB. New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 4022–4032, 2007.

CHEBEL, R. C., M. J. AL-HASSAN, P. M. FRICKE, J. E. P. SANTOS, J. R. LIMA, C. A. MARTEL, J. S. STEVENSON, R. GARCIA, R. L. AX. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 922–931, 2010.

CHEBEL R. Mastitis Effects on Reproduction, in *Proceedings. NMC Regional Meeting*, p. 43-48, 2007.

CHEBEL, R.C., J.E.P. SANTOS, J.P. REYNOLDS, R.L.A. CERRI, S.O. JUCHEM, M. OVERTON. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 239, 2004.

DEMETRIO, D. G. B., R. M. SANTOS, C. G. B. DEMETRIO, J. L. M. VASCONCELOS. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p.5073–5082, 2007.

DEMETRIO, D. G. B. & J. L. M. VASCONCELOS. Manejo reprodutivo de vacas sob estresse térmico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, p. 378-383, 2011.

DOSOGNE H, E. MEYER, A. STURK, J. VAN LOON, A.M. MASSART- LEEN, C. BURVENICH. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. *Inflammation Research*, v. 51, p. 201–205, 2002.

DROST, M., J. D. AMBROSE, M.-J. THATCHER, C. K. CANTRELL, K. E. WOLFSDORF, J. F. HASLER, W. W. THATCHER. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* v. 52, p. 1161–1167, 1999

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

EALY, A. D., M. DROST, P. J. HANSEN. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2899–2905, 1993.

FAOSTAT 2011, disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>> . Acessado em 14/05/13.

GIRI S.N., Z. CHEN, E.J. CARROLL, R. MUELLER, M.J. SCHIEDT, L. PANICO. Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by *Escherichia coli* endotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, v. 45, p. 586–591, 1984.

GOLDBERG, J. J., E. E. WILDMAN, J. W. PANKEY, J. R. KUNKEL, D. B. HOWARD, B. M. MURPHY. The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 96–104, 1992.

HANSEN P. J, P. SOTO, R.P. NATZKE. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in pregnancy mortality. *American Journal Reproductive Immunology*, v. 51, p. 294 –301, 2004.

HARRIS, B. L. & E. S. KOLVER. Review of holsteinization on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, v.84 (E Suppl.), p. E56–E61, 2001.

HERATH, S., E. J. WILLIAMS, S. T. LILLY, R. O. GILBERT, H. DOBSON, C. E. BRYANT, I. M. SHELDON. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, v. 134, p.683–693, 2007.

HERTL, J. A., Y. T. GROHN, J. D. G. LEACH, D. BAR, G. J. BENNETT, R. N. GONZALEZ, B. J. RAUCH, F. L. WELCOME, L. W. TAUER, Y. H. SCHUKKEN. Effects of clinical mastitis caused by grampositive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 1551–1560, 2010.

HOCKETT M.E., ALMEIDA R.A., ROHRBACH N.R., OLIVER S.P., DOWLEN H.H., SCHRICK F.N. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2422–2431, 2005.

HOCKETT M. E., F. M. HOPKINS, M. J. LEWIS, A. M. SAXTON, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER, F.N. SCHRICK. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 241–251, 2000.

HUDSON, C. D., A. J. BRADLEY, J. E. BREEN, M. J. GREEN. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3683–3697, 2012.

KAJIKAWA, S., N. KAGA, Y. FUTAMURA, C. KAKINUMA, Y. SHIBUTANI. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. *Journal of Pharmacological Toxicological Methods*, v. 39, p. 147–154, 1998.

KANEENE, J. B., R. MILLER. Epidemiological study of metritis in Michigan dairy cattle. *Veterinary Research*, v. 25, p. 253–257, 1994.

LAVON, Y., E. EZRA, , G. LEITNER, , D. WOLFENSON, Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4538–4545, 2011.

LeBLANC, S. J., T. F. DUFFIELD, K. E. LESLIE, K. G. BATEMAN, G. P. KEEFE, J. S. WALTON, W.H. JOHNSON, Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2223–2236, 2002.

LIMA, J. R., F. A. RIVERA, C. D. NARCISO, R. OLIVEIRA, R. C. CHEBEL, J. E. P. SANTOS. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5436–5446, 2009.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will end? *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1277–1293, 2001.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction*, v. 61, p. 415–427, 2003.

McDOUGALL, S., F.M. RHODES, G.A. VERKERK. Pregnancy loss in dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 53, p. 279, 2005.

MOORE, D.A., M.W. OVERTON, R. C. CHEBEL, M.L. TRUSCOTT, R.H. BONDURANT. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 226, p. 1112–1118, 2005.

NMC Newsletter "Udder Topics", August, 2000, Excerpted from the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs "Animal Health News, Vol. 7, No. 4, December 1999

NMC Publication "Current Concepts of Bovine Mastitis" p. 1, 1996.

NMC Regional Meeting Proceedings, p. 40 From the National Mastitis Council Newsletter "Udder Topics", August 1998.

NORMAN, H.D., COOPER, T.A., ROSS, F.A. Somatic cell counts of milk from Dairy Herd Improvement herds during 2012. Disponível em: <<http://aipl.arsusda.gov/publish/dhi/current/sccrpt.htm>>. Acessado em 17/4/2013.

OTT, S. L. Presented at the National Mastitis Council 38th Annual Meeting, February 14-17. Published in the National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, p. 152, 1999.

PEREIRA, M. H. C., R.F. COOKE , A. A. ALFIERI, J. L. M. VASCONCELOS. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. Animal Reproduction Science, v. 137, p. 156-162, 2013.

PHILPOT, W. N. & S. C. NICKERSON. Mastitis: Counter Attack. Naperville: Babson Bros, p. 150, 1991.

PINEDO, P. J., P. MELENDEZ, J. A. VILLAGOMEZ-CORTES, C. A. RISCO. Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. Journal of Dairy Science, v. 92, p. 1575–1580, 2009.

PURSLEY, J.R., M. MEEZ, M.C. WILTBANK. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α , and GnRH. Theriogenology, v. 44, p. 915-923, 1995.

PUTNEY D. J., S. MULLINS, W.W. THATCHER, M. DROST, T.S. GROSS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient

temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 19, p. 37–51, 1988.

RIOLLET C., P. RAINARD, B. POUTREL. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science*; v. 84, p. 1077–1084, 2001.

RISCO, C. A., G. A. DONOVAN, J. HERNANDEZ. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1684–1689, 1999.

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

SANTOS, J. E. P., C. D. NARCISO, F. RIVERA, W. W. THATCHER, R. C. CHEBEL. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p.2976–2988, 2010.

SANTOS J. E. P, W. W. THATCHER, R. C. CHEBEL, R. L. A. CERRI, K. N. GALVÃO. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, v. 83, p. 513–535, 2004.

SANTOS, J. E. P., R. L. A. CERRI, M. A. BALLOU, G. E. HIGGINBOTHAM, J. H. KIRK. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 31-45, 2004.

SARGEANT J. M., Y. H. SCHUKKEN, K. E. LESLIE. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1545–1554, 1998.

SARTORI, R., R. SARTOR-BERGFELT, S. A. MERTENS, J. N. GUENTHER, J. J. PARRISH, M.C. WILTBANK. Fertilization and early embryonic development in

heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2803–2812, 2002.

SARTORI, R., A. GUMEN, J. N. GUENTHER, A. H. SOUZA, D. Z. CARAVIELLO, M. C. WILTBANK. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 65, p. 1311–1321, 2006.

SCHEPERS A. J., T. J. LAM, Y. H. SCHUKKEN, J. B. WILMINK, W. J. HANEKAMP. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters, *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1833–1840, 1997.

SCHRICK, F. N., M. E. HOCKETT, A. M. SAXTON, M. J. LEWIS, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER.. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1407–1412, 2001.

SMITH, K. L. & J. S. HOGAN. The world of mastitis. *Proc. 2nd Inter'l Symp. Mastitis and Milk Quality*, p. 1, 2001.

TENHAGEN B. A., M. DRILLICH, R. SURHOLT, W. HEUWIESER. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 85-94 2004.

SOTO, P., R. P. NATZKE, P. J. HANSEN. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F_{2α} and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal Reproductive Immunology*, v. 50, p. 263–272, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M., D. G. B. DEMÉTRIO, R. M. SANTOS, J. R. CHIARI, C. A. RODRIGUES, O. G. SÁ FILHO. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, v. 65, p. 192–200, 2006.

VASCONCELOS, J. L. M., R. F. COOKE, D. T. G. JARDINA, F. L. ARAGON, M. B. VERAS, S. SORIANO, N. SOBREIRA, A. B. SCARPA. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 2011.

VASCONCELOS, J. L. M., R. W. SILCOX, G. J. M. ROSA, J. R. PURSLEY, M. C. WILTBANK. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 52, p. 1067-1078, 1999.

WASHBURN, S. P., W. J. SILVIA, C. H. BROWN, B. T. MCDANIEL, A. J. MCALLISTER. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 244–251, 2002.

WILLIAMS, E. J., K. SIBLEY, A. N. MILLER, E. A. LANE, J. FISHWICK, D. M. NASH, S. HERATH, G. C. ENGLAND, H. DOBSON, I. M. SHELDON. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 60, p. 462–473, 2008.

WILSON, D. J., Y. T. GROHN, G. J. BENNETT, R. N. GONZALEZ, Y. H. SCHUKKEN, J. SPATZ. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 3869–3879, 2008.

CAPÍTULO 2

RELAÇÃO ENTRE CCS E INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E IMPACTO NA P/TE DE VACAS EM LACTAÇÃO

Relação entre CCS e infecção intramamária e impacto na P/TE de vacas em lactação

RESUMO

Os objetivos destes estudos foram (1) determinar a sensibilidade (Se.) e especificidade (Sp.) de diferentes limiares de CCS para identificar mastite subclínica; (2) verificar o impacto do isolamento de bactérias causadoras de mastite e da CCS durante protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) na P/TE de vacas em lactação. No Exp.1, 2.516 vacas Holandesas e Girolando (8 fazendas), foram submetidas a coleta de duas amostras de leite para análise de CCS e cultura microbiológica para determinar o crescimento bacteriano. No Exp.2, 1.397 vacas Girolando em lactação foram submetidas a um protocolo de TETF. Amostras de leite foram coletadas dois dias antes da TETF para cultura microbiológica e análise de CCS. O diagnóstico de gestação foi realizado nos dias 31 e 66. Os animais foram divididos de acordo com o isolamento apresentado, em 5 grupos experimentais segundo recomendações do “national mastitis council” (NMC): Gram-positivas ambientais (AB+; *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp, *Micrococcus* spp.), Gram-negativas ambientais (AB-; *Citrobacter freundii*, Coliformes, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp.), Gram-positivas contagiosas (C+; *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*), SCN (Estafilococos coagulase negativa) e Controle (isolamento negativo). No experimento 1, três limiares de CCS (100.000, 200.000 e 400.000 céls./ml) foram utilizados para determinar a Se. e Sp. em detectar infecção intramamária (IIM). Os SCN foram agrupados com o grupo Controle para as análises do Exp.2, pois o isolamento destes agentes em geral não está associado a doença da glândula mamária. Os animais também foram classificados em três grupos de acordo com a CCS: menor que 200.000 céls./mL, entre 200.000 e 400.000 céls./mL e maior que 400.000 céls./mL. Foi utilizado o PROC GLIMMIX do SAS para a análise estatística. Considerou-se $P < 0,05$ como significativo e $P < 0,10$ tendência. No Exp.1, a prevalência geral de IIM foi de 58,7%. A Se. e Sp. para os diferentes limiares de CCS variaram de acordo com o grupo de patógenos. Em geral a maior Se. (78,14%) foi atingida com o limiar de 100.000 céls./mL. No Exp.2, houve efeito do grupo de bactéria sobre a P/TE aos 31 e 66 d ($P < 0.01$). A P/TE aos 31 d nos grupos [AB-]

(30,1% [68/201]) e [AB+] (29,9% [24/82]) foi menor do que o grupo controle (44,0 [367/869]). A P/TE do grupo [C+] (36,6% [85/245]) tendeu ($P=0,09$) a ser menor que o controle. Animais com CCS maior que 400.000 céls./mL tiveram menor P/TE ($P<0,01$) que animais com CCS menor que 200.000 céls./mL. O uso de uma única análise de CCS por animal pode não ser um parâmetro eficaz para detectar IIM já que a Se. e Sp. foram baixas nos limiares estudados. CCS elevada e isolamento bacteriano reduzem a P/TE de receptoras de embrião em lactação.

Palavras Chave: Embrião FIV, Mastite, Isolamento Bacteriano, CCS

Relationship between SCC and intramammary infection and its impact on P/ET in lactating dairy cows

ABSTRACT

The objectives of these studies were (1) determine the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of different SCC thresholds to identify subclinical mastitis, (2) assess the impact of microorganism causative of mastitis and SCC during fixed-time embryo transfer (FTET) protocol in P/ET in dairy cows. In study 1, 2516 Holstein and Girolando cows (8 farms) were enrolled. Two composite milk samples were collected from each cow, one for SCC analysis and other for bacteriological analysis. In study 2, 1397 Girolando lactating cows were subjected to a FTET. Milk samples were collected two days before the ET for bacteriological analysis and SCC. Pregnancy diagnosis was performed on days 31 and 66. The animals were split according to the bacterial growth in 5 experimental groups according to the recommendations of the "National Mastitis Council" (NMC): Gram-positive environmental (AB +; *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp.), Gram-negative environmental (AB-, *Citrobacter freundii*, Coliforms, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp.), Gram-positive contagious (C+; *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*), CNS (coagulase-negative staphylococci) and control (no bacteria growth). In experiment 1, three SCC thresholds (100,000, 200,000 and 400,000 cells/ml) were used to determine the Se. and Sp. in detect intramammary infection (IMI). The CNS were grouped with the control group for the analysis of study 2 because the growth of these agents is not usually associated with mammary gland disease. The cows were also classified into three groups according to the SCC: less than 200,000 cells/ml, between 200,000 and 400,000 cells/ml, and greater than 400,000 cells/ml. SAS PROC GLIMMIX was used for statistical analysis. For analysis $P < 0.05$ was considered as significant and $P < 0.10$ trend. In study 1, the overall prevalence of IMI was 58.7%. Se. and Sp. of selected SCC thresholds varied according to the group of pathogen. In general, the greater Se. (78.14%) was achieved with 100,000 cells/ml threshold. In study 2 effect of bacteria group in P/ET at 31 and 66 d ($P < 0.01$) was detected. P/ET was lower than control (44.0% [367/869]) at 31 d in [AB-]

(30.1% [68/201]) and [AB +] (29.9% [24/82]) groups. The group [C +] (36.6% [85/245]) tended ($P = 0.09$) to be lower than the control. Cows with SCC greater than 400,000 cells/ml had lower P/ET ($P < 0.01$) than animals with SCC lower than 200,000 cells/ml. The use of a single SCC analysis for each animal may not be an effective parameter to detect IMI, because Se. and Sp. were low in all studied thresholds. Elevated SCC and bacterial isolation reduce the P/ET of lactating embryo recipients.

Keywords: IVF embryos, Mastitis, Bacterial Isolation, SCC

1. Introdução

Estudos mostram redução na eficiência reprodutiva associada ao incremento no mérito genético para produção de leite (Butler, 1998; Lucy, 2001; Washburn et al., 2002). Esta redução ocorre em sistemas de vacas de alta produção e dieta completa, típico dos EUA e Canadá, e em sistemas baseados em pasto e vacas de menor produção, típico da Nova Zelândia (Harris & Kolver, 2001; Lucy, 2003). Uma das possíveis causas para a menor eficiência reprodutiva é a alta prevalência de doenças infecciosas, como IBR, BVD e mastite (Schrack et al., 2001; Hansen et al., 2004, Santos et al., 2004; Pereira et al., 2013). A intensificação dos sistemas de produção de leite aumentaram o risco de infecções intramamárias (IIM) e uterinas (Goldberg et al., 1992; Kaneene & Miller, 1994), sendo estas duas doenças consideradas fatores de risco para a fertilidade de vacas leiteiras (Hansen et al., 2004; Le Blanc et al., 2002).

A mastite é uma das infecções mais comuns nos rebanhos leiteiros, com incidência de 50 a 70 casos por 100 vacas/ano (Bradley et al., 2007). Smith & Hogan (2001), estimaram que o custo da mastite para a indústria leiteira dos Estados Unidos é ao redor de dois bilhões de dólares por ano ou 11% de toda a produção de leite do país.

O monitoramento das IIM é fundamental para manter a qualidade do leite e a saúde do rebanho (Reis et al., 2011). Existem diversos métodos de diagnóstico de mastite e a cultura microbiológica das amostras de leite é considerada o método padrão (Dohoo et al., 2011), porém, geralmente é caro e trabalhoso para ser utilizado na rotina (Reis et al., 2011). Em geral, a Contagem de Células Somáticas (CCS) individual é utilizada já que este método está amplamente disponível para os produtores de leite (Schukken et al., 2003). Por isso, é necessário entender qual valor de CCS pode melhor estimar uma IIM.

A relação entre IIM e redução do desempenho reprodutivo foi relatada em diversos estudos (Barker et al., 1998; Santos et al., 2004; Hertl et al., 2010). Mesmo na forma subclínica a mastite pode causar diminuição da fertilidade (Hudson et al., 2012), Schrack et al., (2001) relataram que animais com mastite clínica ou subclínica, apresentaram intervalo parto a primeira IA, dias aberto e serviços por concepção maiores que animais saudáveis. Moore et al., (2005) também relataram a importância da mastite subclínica, vacas com CCS maior que 300.000 céls./ml antes da IA foram 2,4 vezes mais propensas a perder a gestação, entre o d 28 e d 40, que vacas com CCS

menor que 300.000 céls/ml (30% vs. 12.5%). Segundo Philpot & Nickerson (1991), para cada caso clínico de mastite existem entre 15 e 40 casos subclínicos.

Os mecanismos pelos quais a mastite subclínica pode afetar a fertilidade de vacas leiteiras ainda não estão bem elucidados. Entre os possíveis fatores são descritos: falha na ovulação e menor produção de estradiol 17β (Hockett et al., 2005), menor manifestação de estro (Hockett et al., 2000) maior produção de PGF2 α (Hansen et al., 2004), aumento da temperatura corporal (Putney et al., 1988) e liberação de moléculas que podem afetar o oócito (LPS) e embrião (óxido nítrico [ON]) (Soto et al., 2003). Neste estudo foram utilizados apenas animais submetidos a transferência de embrião (TE). Pelo fato da TE ser feita apenas com embriões que já passaram por períodos críticos como o desenvolvimento oocitário e o desenvolvimento embrionário inicial (Ealy et al., 1993), a utilização desta biotecnologia torna-se interessante para entender os mecanismos pelos quais a mastite subclínica afeta a fertilidade de vacas leiteiras.

Os objetivos destes estudos foram (1) determinar a Se e Sp de diferentes limiares de CCS para identificar mastite subclínica; (2) verificar o impacto do isolamento de bactérias causadoras de mastite e da CCS durante protocolo de TETF na Prenhez por TE (P/TE) de vacas em lactação. Nossa hipótese é que IIM está associada a aumento de CCS e que ambos afetam negativamente a P/TE de vacas em lactação.

2. Material e Métodos

2.1. Animais, instalações e tratamentos

2.1.1. Experimento 1

Este estudo foi realizado em oito fazendas, na região sudoeste de Minas Gerais, com diferentes sistemas de produção (3 confinados, 4 semi confinados e 1 pasto). Um total de 2.516 vacas Holandesas (fazendas 2, 3 e 8) e Girolando (fazendas 1, 4, 5, 6 e 7) com dias em lactação (DEL) médio de 175,12 ($\pm 9,2$) e produção média de 25,4 ($\pm 0,9$) Kg de leite/dia foram submetidas a coleta de duas amostras de leite no mesmo momento, uma para análise de CCS e outra para cultura microbiológica. As amostras foram coletadas

de todas as vacas que estavam em lactação no dia da visita. Animais com sintomas de mastite clínica não foram utilizados neste estudo.

Em todos os oito rebanhos a ordenha era realizada duas vezes ao dia e todos utilizavam as mesmas práticas de controle da mastite: teste da caneca de fundo preto para verificar a existência de mastite clínica, pré dipping, secagem dos tetos com toalha de papel descartável e pós dipping. Terapia de vaca seca e tratamento dos casos clínicos também faziam parte do programa de controle da mastite.

2.1.2. Experimento 2

O experimento 2 foi conduzido em uma fazenda comercial de bovinos leiteiros na região sudoeste de Minas Gerais. Foram utilizadas 1.397 vacas Girolando (1/2, 5/8, 3/4 e 7/8 Hol) com DEL médio de 125,85 ($\pm 6,2$) e produção média de 19,2 ($\pm 0,67$) Kg de leite/dia. Os animais foram mantidos em sistema de semi confinamento, com pastagem de capim Mombaça e suplementação de silagem de milho e ração, para igualar ou exceder as exigências nutricionais. A ordenha foi realizada duas vezes ao dia e as práticas de controle da mastite foram as mesmas utilizadas pelas fazendas do Experimento 1. Duas amostras de leite foram coletadas de cada animal, dois dias antes da TE (Figura 1) para realização de cultura microbiológica e mensuração da CCS. A produção de leite foi mensurada no mesmo dia.

Todas as vacas com mais de 40 dias pós parto foram avaliadas por ultrassonografia (Mindray - 2200VET DP; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics CO., Shenzhen, China) e aquelas sem patologias visíveis no útero e ovários foram submetidas a um protocolo de TETF (Figura 1): Dia -11: inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR® 1,9mg - Zoetis, SP - Brasil), administração de 2mg de benzoato de estradiol IM (2ml de Estrogin® - Farmavet, Brasil); Dia -4: 25mg de dinoprost IM (5ml Lutalyse® - Zoetis, SP - Brasil); Dia -2: retirada do CIDR®, administração de 1mg de cipionato de estradiol IM (0,5ml ECP® Zoetis, SP - Brasil). No dia 7 foi realizada nova ultrassonografia em todos os animais a fim de detectar a presença de corpo lúteo (CL). Apenas as vacas que apresentavam CL receberam embrião. Os embriões transferidos foram produzidos pela técnica de Fertilização *in vitro* (FIV) e classificados segundo recomendações de Mapletoft (2006).

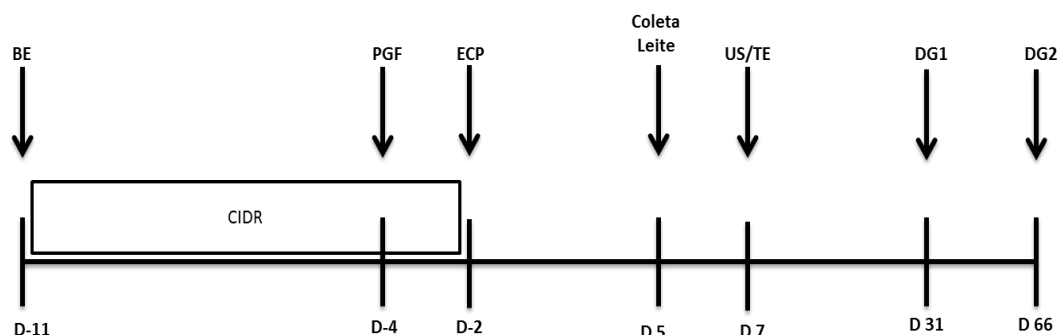


Figura 1. Diagrama esquemático do experimento 2. **D-11**: aplicação de 2mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do CIDR; **D-4**: aplicação de 25mg de Dinoprost; **D-2**: retirada do CIDR e aplicação de 1mg de ECP (Cipionato de Estradiol); **D5**: mensuração da produção e coleta de amostras de leite para análise de CCS e cultura microbiológica; **D7**: avaliação ultrassonográfica dos ovários para detecção de CL, e TE nos animais com CL; **D31**: primeiro diagnóstico de gestação; **D66**: segundo diagnóstico de gestação.

2.2. Coleta de amostras para cultura microbiológica e CCS

Para coleta de amostra para cultura microbiológica, os tetos foram desinfetados pelo pre-dipping e após a secagem dos mesmos, as extremidades limpas com álcool 70%. Os três primeiros jatos de leite foram descartados e posteriormente foi realizada a coleta de uma amostra composta dos quatro tetos em tubo estéril. Todas as amostras foram compostas por leite dos quatro tetos. Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em recipientes com gelo (temperatura 4-5 °C) e posteriormente congeladas e enviadas para laboratório (VidaVet - Botucatu, SP, Brasil). Para mensuração da contagem de células somáticas (CCS), as amostras foram coletadas em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e analisadas na Clínica do Leite (Piracicaba, SP - Brasil) por citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley, Chaska, MN).

2.3. Cultura microbiológica

Semeou-se 0,1 mL por amostra em meio de ágar suplementado com sangue bovino (10%) desfibrinado em meio de MacConkey. As amostras foram incubadas em aerobiose, a 37°C por 24-48 horas. As colônias foram submetidas a provas bioquímicas e de diferenciação bacteriana quando em crescimento no ágar MacConkey. As leituras

das placas foram procedidas as 24 e 48 horas com a descrição da macro morfologia das colônias. A micro morfologia foi executada pelo esfregaço em lâmina e corada pela Técnica de Gram. A identificação microbiológica foi realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com QUINN et al. (2005).

2.4. Classificação das bactérias

Após o resultado do isolamento e identificação microbiana, os animais foram divididos, de acordo com o isolamento apresentado, em 5 grupos conforme estabelecido pelo *National Mastitis Council* (NMC) , 1996.

1. Controle: (Não isolamento bacteriano).
2. SCN: (Estafilococos Coagulase Negativa).
3. Contagiosas Gram +: (C+; *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*).
4. Ambientais Gram +: (AB+; *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp.).
5. Ambientais Gram -: (AB-; *Citrobacter freundii* Coliformes, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.)

Animais com isolamento de mais um tipo de bactéria foram retirados do estudo, crescimento de mais de dois agentes foi considerado contaminação. Após análises prévias verificou-se que a P/TE dos animais com isolamento positivo para SCN foi igual aos animais Controle (42,0 vs. 42,2%), os SCN colonizam naturalmente a pele do úbere e canal do teto e o isolamento destes agentes normalmente não está relacionado a IIM (NMC 1999). Por estes motivos, os SCN foram agrupados com o grupo Controle para as análises do experimento 2.

Os animais também foram divididos de acordo com a patogenicidade dos agentes isolados:

1. Controle: (Não isolamento bacteriano)
2. Agentes Principais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Citrobacter freundii* Coliformes, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.
3. Agentes Secundários: SCN e *Corynebacterium bovis*.

2.5. Se. e Sp. de diferentes limiares de CCS

A sensibilidade é a capacidade de um teste detectar todos os verdadeiro-positivos, quanto menor a Se. maior é o número de falso-negativos. A especificidade é a capacidade de um teste detectar corretamente os verdadeiro-negativos, quanto menor a Sp. maior o número de falso-positivos. Três limiares de CCS (100.000, 200.000 e 400.000 céls./ml) foram testados para determinar a Se. e Sp. em identificar corretamente a infecção intramamária. A cultura microbiológica foi a referência utilizada para avaliar os diferentes limiares de CCS, animais com cultura positiva para algum patógeno foram considerados portadores de IIM.

2.6. Diagnóstico de gestação

Diagnóstico positivo de gestação foi considerado quando detectado a presença de embrião ou feto. A perda de gestação foi definida pela observação de retorno ao cio ou pelo exame de ultrassonografia onde vacas que estavam gestantes no primeiro diagnóstico não estavam gestantes no segundo diagnóstico. Os exames foram realizados nos dias 31 e 66.

2.7. Análise estatística

Para análise de sensibilidade e especificidade foram utilizadas as seguintes fórmulas: Sensibilidade=Verdadeiro Positivo/Verdadeiro Positivo + Falso Negativo.

Especificidade=Verdadeiro Negativo/Verdadeiro Negativo + Falso Positivo. As variáveis binomiais P/TE nos dias 31 e 66 e perda de prenhez foram analisadas pelo PROC GLIMMIX (SAS Institute Inc., Cary, NC). Foram incluídos no modelo inicial os efeitos de grupo de bactéria, CCS, DEL, ordem de parto, produção de leite e interações. Foram feitos dois contrastes, C1: controle vs. presença de agentes (AB+, AB-, e C+) e C2: Presença de agentes ambientais (AB+ e AB-) vs. Presença de agentes contagiosos (C+). Considerou-se $P < 0,05$ como significativo e $P < 0,10$ tendência. Os efeitos significativos foram reportados pela média dos quadrados mínimos. As variáveis não significativas foram excluídas do modelo de acordo com o critério de Wald's. (quando $P > 0,20$).

3. Resultados

3.1. Experimento 1

A prevalência geral de IIM nas amostras analisadas foi de 58,7% (Tabela 1). Considerando apenas as amostras com cultura positiva, os agentes mais frequentemente isolados foram: SCN (31,5%), *Corynebacterium bovis* (23,4%), *Streptococcus agalactiae* (13,8%), *Klebsiella ssp* (9,8%) e *Staphylococcus aureus* (8,6%). Apesar de todos os 8 rebanhos utilizarem as mesmas práticas de controle da mastite a prevalência de patógenos variou entre as fazendas (Tabela 1).

1

Tabela 1: Prevalência de patógenos causadores de mastite nas oito fazendas do Experimento 1.

Microrganismo	Rebanho (n)								Total	Total (%)	Cultura Positiva (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Total amostras (no.)	243	153	266	244	295	97	850	428	2576		
Amostras com cultura negativa (no.)	114	52	127	73	127	26	253	189	961	37,3	
Amostras com cultura positiva (no.)	122	98	132	164	160	71	581	227	1555	60,4	
Contaminadas	7	3	7	7	8	-	16	12	60	2,3	
<i>Corynebacterium bovis</i>	15	23	28	36	33	8	189	43	375	14,6	24,1
<i>Enterobacter</i> spp	5	7	8	-	2	3	20	6	51	2,0	3,3
<i>Escherichia coli</i>	9	3	6	2	21	1	10	10	62	2,4	4,0
<i>Klebsiella</i> spp	18	10	13	12	24	3	44	33	157	6,1	10,1
<i>Pseudomonas</i> spp	9	-	3	1	13	1	9	2	38	1,5	2,1
SCN	31	35	51	18	32	30	168	95	460	17,9	29,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	-	9	45	16	11	47	5	140	5,4	9,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	25	3	11	47	19	6	91	19	221	8,6	14,3
<i>Streptococcus bovis</i>	3	3	3	3	-	5	2	6	25	1,0	1,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	8	-	-	-	3	-	5	16	0,6	1,0
<i>Streptococcus uberis</i>	-	6	-	-	-	-	1	3	10	0,4	0,7

Tabela 2. Sensibilidade (Se.) e especificidade (Sp.) de todas as amostras e por grupo de bactérias para diferentes limiares de CCS.

Grupo ¹ (n)	CCS Referência ²	Sensibilidade	Especificidade
Geral	100	78,14	49,84
	200	60,32	65,14
	400	42,64	78,15
C+	100	86,71	49,84
	200	72,81	65,14
	400	56,95	78,15
SCN	100	74,00	49,84
	200	48,24	65,14
	400	25,99	78,15
AB+	100	77,71	49,84
	200	61,41	65,14
	400	39,67	78,15
AB-	100	63,67	49,84
	200	48,63	65,14
	400	37,25	78,15

¹ AB+: Presença de bactérias ambientais gram-positivas. AB- Presença de bactérias ambientais gram-negativa. C+: Presença de bactérias contagiosas gram-positivas. SCN: Estafilococos coagulase negativo.² Contagem de células somáticas por ml utilizada como limite máximo de referência, valores desta coluna devem ser multiplicados por 1.000.

A Se. e a Sp. em identificar IIM causadas por diferentes grupos de patógenos estão apresentados na Tabela 2 para diferentes limiares de CCS. A Se. em detectar animais com a IIM, baseado em CCS como referência (100.000, 200.000 ou 400.000), foi mais baixa nos animais com isolamento de bactérias ambientais ou SCN (Tabela 2). Quando os animais foram divididos de acordo com a patogenicidade do agente isolado, em todos os limiares estudados, agentes principais apresentaram Se. maior que agentes secundários (Tabela 3). Aumento do limiar de CCS de 100 para 400.000 céls./ml resultou em aumento da Sp. e redução da Se. em todos os grupos estudados. Como esperado, quanto mais alto o valor de CCS utilizado como referência, maior foi a ocorrência de falso-negativos (Tabela 2 e 3).

Tabela 3. Sensibilidade (Se.) e especificidade (Sp.) por grupo de bactérias para diferentes limiares de CCS.

Grupo ¹ (n)	CCS Referência ²	Sensibilidade	Especificidade
Principais	100	79,3	49,84
	200	64,7	65,14
	400	49,2	78,15
Secundários	100	77,0	49,84
	200	56,3	65,14
	400	36,4	78,15

¹Principais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Citrobacter freundii* Coliformes, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. Secundário: SCN e *Corynebacterium bovis*.²Contagem de células somáticas por ml utilizada como limite máximo de referência, valores desta coluna devem ser multiplicados por 1.000.

3.2. Experimento 2

Tabela 4. Número de animais, produção de leite, dias em lactação (DEL), número de serviços e ordem de lactação por grupo de bactérias.

Item	Grupo ¹			
	Controle	AB+	AB-	CT+
Vacas, n	869	82	201	245
Leite (Kg/dia)	19,4(±0,37)	19,3(±0,89)	19,1(±0,67)	18,7(±0,60)
DEL ²	122,7(±3,5)	118,5(±11,6)	136,6(±7,3)	130,4(±3,5)
Nº Serviços ³	1,8(±0,1)	1,7(±0,3)	2,0(±0,2)	2,1(±0,2)
Ordem	2,2(±0,1)	2,4(±0,2)	2,5(±0,1)	2,4(±0,1)

¹ Controle: Nenhuma bactéria detectada. AB+: Presença de bactérias ambientais gram positivas. AB- Presença de bactérias ambientais gram negativas. CT+: Presença de bactérias contagiosas gram positivas. ²Dias em lactação médio no dia da TE. ³ Número de serviços (TE) .

A produção de leite, DEL, Nº de serviços e ordem foram semelhantes nos grupos estudados (Tabela 4). A prevalência geral de IIM nas amostras analisadas foi de 55,9% (Tabela 3). Considerando apenas as amostras com cultura positiva, os agentes mais frequentemente isolados foram: SCN (32,8%), *Corynebacterium bovis* (16,2%), *Streptococcus agalactiae* (12,6%), *Escherichia coli* (11,7) e *Klebsiella* ssp (8,8%).

Tabela 5: Prevalência de patógenos causadores de mastite (Experimento 2).

Microrganismo	Total (no.)	Total (%)	Cultura Positiva (%)
Total Amostras	1407		
Amostras com cultura negativa	611	43,3	
Amostras com cultura positiva	786	55,9	
Contaminadas	10	0,8	
<i>Bacillus ssp</i>	24	1,7	3,1
<i>Citrobacter freundii</i>	3	0,2	0,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	127	9,0	16,2
<i>Enterobacter spp</i>	13	0,9	1,7
<i>Enterococcus spp</i>	14	1,0	1,8
<i>Escherichia coli</i>	92	6,5	11,7
<i>Klebsiella spp</i>	69	4,9	8,8
<i>Micrococcus spp</i>	20	1,4	2,5
<i>Pseudomonas spp</i>	24	1,7	3,1
SCN	258	18,3	32,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	1,3	2,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	99	7,0	12,6
<i>Streptococcus bovis</i>	8	0,6	1,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7	0,5	0,9
<i>Streptococcus uberis</i>	9	0,6	1,1

Animais com isolamento positivo de agentes causadores de mastite tiveram menor P/TE aos 31 e aos 66 dias em relação ao controle (Tabela 4). Agentes ambientais independentemente se gram-positivos ou gram-negativos reduziram a P/TE aos 31 e 66 d e agentes contagiosos gram-positivos tiveram tendência ($P=0.09$) a diminuir P/TE aos 31 d em relação ao controle. Não houve efeito do isolamento bacteriano na perda de gestação (Tabela 4).

Tabela 6. Efeito do isolamento de agentes causadores de mastite subclínica sobre a P/TE e perda de gestação em vacas leiteiras.

Item % (n/n)	Grupo ¹				Contraste ²	
	Controle	AB+	AB-	C+	C1	C2
Prenhez						
d 31	44 (367/869) ^{ax}	29,9 (24/82) ^b	30,1 (68/201) ^b	36,6 (86/245) ^{by}	P=0,0069	P=0,2312
d 66	32,6 (286/864) ^a	18,1 (17/82) ^b	19,6 (52/197) ^b	28,1 (69/243) ^{ab}	P=0,0013	P=0,0762
Perda de Gestação	20,6 (81/367)	33,3 (7/24)	25,8 (16/68)	17,0 (17/86)	P=0,3530	P=0,1290

^{a-b}Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,01). ^{x-y}Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes P(<0,10). ¹ Controle: Vacas sem isolamento. AB+: Isolamento de bactérias ambientais gram-positivas. AB-: Isolamento de bactérias ambientais gram-negativas. C+: Isolamento de bactérias contagiosas gram-positivas. ² C1: controle vs. isolamento de agentes (AB+, AB-, E C+). C2: Isolamento de agentes ambientais (AB+ e AB-) vs. Isolamento de agentes contagiosos (C+).

No contraste 2 vacas com isolamento de agentes ambientais apresentaram tendência (P < 0.10) de redução da P/TE no d 66 comparados com animais com crescimento de agentes contagiosos.

Tabela 7. Efeito do isolamento de agentes principais ou secundários sobre a P/TE e perda de gestação em vacas leiteiras.

Item % (n/n)	Grupo ¹			Contraste ²
	Controle	Principais	Secundários	
Prenhez				
d 31	43,2 (258/611) ^a	32,1 (133/411) ^b	41,1 (154/385) ^a	P =0,03
D 66	33,5 (200/607) ^a	24,4 (102/396) ^b	32,3 (122/383) ^a	P =0,09
Perda de Gestação	20,2 (54/258)	19,1 (26/133)	18,2 (30/154)	P =0,42

^{a-b}Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,01). ¹Controle: Vacas sem isolamento. ¹Principais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Citrobacter freundii* Coliformes, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. Secundário: SCN e *Corynebacterium bovis*. ² Contraste: controle vs. isolamento de agentes (Principais + Secundários).

Animais com isolamento de agentes principais apresentaram menor P/TE no d 31 e 66 e animais com isolamento de agentes secundários apresentaram P/TE igual ao grupo controle (Tabela 7)

A CCS também impactou a P/TE, vacas com CCS acima de 400.000 céls./ml apresentaram menor P/TE, aos 31 e 66 dias, que vacas com CCS menor que 200.000 céls./ml. Não houve efeito da classe de CCS sobre a perda de gestação (Figura 2). Interação entre CCS e isolamento bacteriano não foi detectada.

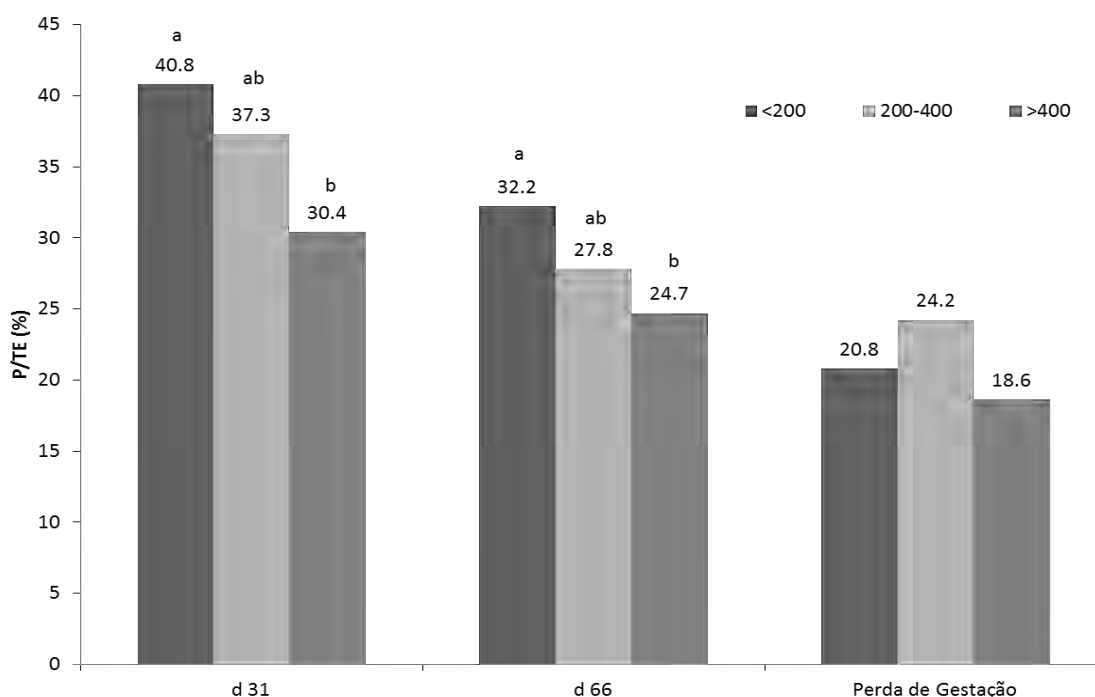


Figura 2. P/TE de acordo com a CCS. Os animais foram divididos em três classes de CCS: 1) < 200.000 céls./ml n=716, 2) de 200 a 400.000 céls./ml n= 134 e 3) mais que 400.000 céls./ml n=247.

4. Discussão

No presente estudo quando se usou como limiar a CCS de 200.000 céls./ml, sugerida por alguns autores (Dohoo & Leslie, 1991; Lavens et al., 1997;), encontrou-se Se. e Sp. de 60,32% e 65,14% respectivamente. Utilizando o mesmo limiar, os valores de Se. (74,5%) e de Sp. (89,6%) foram maiores em estudo de Schepers et al., (1997). Neste estudo foram utilizadas amostras compostas dos quatro tetos, já Schepers et al., (1997) utilizaram amostras individuais por teto, podendo ser esta uma possível explicação para a diferença na Se. e e Sp. dos dois estudos. Porém, Reis et al., (2011) também utilizando amostras individuais por teto e 200.000 céls./ml como limiar, encontraram Se. ainda mais baixa (51,5%). Dohoo & Leslie (1991), também utilizando o mesmo limiar e amostras composta, encontraram Se. de 83,4% e Sp. de 58,9%. A diferença na Se. pode ser explicada pelo tipo de patógeno prevalente, algumas bactérias

são capazes de causar um aumento maior na CCS do que outras. Quando as bactérias são separadas por classes (Tabela 1), os agentes contagiosos gram-positivos apresentam maior Se. que os agentes ambientais ou SCN, já que estes dois últimos grupos de patógenos induzem uma resposta relativamente pequena na CCS (NMC, 1999).

Andersen et al., (2010) consideraram a cultura microbiológica de amostras em triplicata como sendo o padrão-ouro para detectar IIM, porém no presente estudo foi utilizada uma amostra por animal. Segundo Dohoo et al., (2011), a utilização de apenas uma amostra é aceitável para identificar IIM causada pela maioria dos patógenos e comparada com o padrão-ouro apresentou Se. de 85,8% e Sp. de 75,1%.

Segundo McDermott et al., (1982) o objetivo principal de escolher um limiar específico de CCS é otimizar o programa de controle de mastite. A utilização do limiar adequado minimiza os erros de diagnóstico de infecções intramamárias e diminui a propagação dos agentes dentro do rebanho (Reis et al., 2011). No presente estudo o limiar de 100.000 céls./ml teve maior Se. em detectar IIM. Reis et al., (2011) relataram que o limiar de 100.000 céls./ml é o mais adequado para diferenciar quartos infectados de não infectados e reduzir o número de resultados falso-negativos. A utilização de limiares maiores (200.000, 300.000 ou 400.000 céls./ml) resulta em maior número de falso-negativos o que pode ser crítico na implementação de um programa de controle de mastite em rebanhos (Reis et al., 2011). Além disso, quartos mamários com mais de 100.000 céls./ml estão, geralmente, relacionados a processo inflamatório na glândula mamária de vacas holandesas (Schwarz et al., 2010). A alta prevalência de IIM nos rebanhos estudados indica que o programa padrão de prevenção de mastite não está adequado.

Estudos têm mostrado efeitos deletérios da mastite sobre a fertilidade de vacas leiteiras tanto na forma clínica quanto na forma subclínica (Schrack et al., 2001; Santos et al., 2004; Hertl et al., 2010; Hudson et al., 2012). Em geral, os trabalhos com mastite subclínica são baseados na CCS (Pinedo et al., 2009; Lavon et al., 2011; Hudson et al., 2012), porém, diferentemente de outros estudos, neste trabalho, a mastite subclínica foi avaliada com base no isolamento de agentes causadores da doença. A presença de bactérias causadoras de mastite diminuiu a P/TE (Tabela 4). Alguns autores (Hansen et al., 2004; Soto et al., 2003) afirmam que os distúrbios na fertilidade de vacas com mastite são causados apenas por bactérias gram-negativas, e que estes distúrbios seriam

mediados pelo LPS (lipopolissacarídeo exclusivo de bactérias gram-negativas). Porém, neste estudo, foi encontrado impacto na P/TE independente do tipo de bactéria isolada (Contraste 1, Tabela 4), estes resultados concordam com os de Baker et al., (1998), Schrinck et al., (2001) e Santos et al., (2004) que demonstraram que bactérias gram-positivas e gram-negativas impactam negativamente na fertilidade de vacas leiteiras.

Animais apresentando isolamento de agentes ambientais tiveram tendência em diminuir a P/TE no d 66 quando comparados com animais com isolamento de agentes contagiosos (Contraste 2, Tabela 4). Esta tendência pode ser explicada devido ao alto número de animais com isolamento de *Corynebacterium bovis* no grupo dos agentes contagiosos (127/245), sendo esta bactéria considerada de menor patogenicidade (Sheppers et al., 1997).

O presente estudo mostrou que a CCS alta também tem impacto negativo sobre a fertilidade, vacas que apresentaram CCS maior que 400.000 céls./ml tiveram a P/TE reduzida em 25,5% (Figura 2). Hudson et al. (2012) também observaram redução da performance reprodutiva de vacas com CCS acima de 399.000 céls./ml. De forma semelhante, Pinedo et al. (2011), relataram que vacas com CCS maior que 300.000 céls./ml antes da IA tiveram um risco 44% menor de se tornarem gestantes do que vacas com CCS menor que 300.000 céls./ml.

Os mecanismos pelos quais a mastite pode afetar a performance reprodutiva ainda não são totalmente conhecidos, principalmente quando se trata da sua forma subclínica. A mastite desencadeia a produção de uma série de moléculas bioativas (IL-1 β , IL-8, TNF α , LPS, ON e PGF) que, potencialmente, podem prejudicar os tecidos do trato reprodutivo (Hansen et al., 2004). A liberação destas moléculas é desencadeada em resposta a sinais provenientes da glândula mamária, mas não necessariamente são produzidas na mesma, outros tecidos também podem produzi-las (Hansen et al., 2004). Isto explica o fato de que mesmo sem manifestação clínica na glândula, agentes inflamatórios podem estar envolvidos nos processos de diminuição da fertilidade.

Soto et al., (2003) sugerem que as vacas com mastite tem menor fertilidade devido a distúrbios no desenvolvimento oocitário e clivagem e desenvolvimento embrionário até blastocisto. Menor manifestação de estro (Hockett et al., 2000), falhas na ovulação (Hockett et al., 2005; Williams et al., 2008), interrupção do crescimento folicular (Herath et al., 2007), menor pulsatilidade de LH e menor produção de estradiol

17 β (Hockett et al., 2005) são sugeridos como responsáveis pela diminuição da fertilidade de vacas com mastite. No presente estudo, foi utilizada apenas transferência de embrião, ou seja, todos os animais no d 7 possuíam um CL e receberam um embrião viável de sete dias no estágio de blastocisto. Sendo assim, nenhuma das explicações acima seria plausível para a redução na P/TE encontrada neste estudo. Outro mediador que pode estar envolvido na diminuição da fertilidade de vacas com mastite, é o óxido nítrico (ON) (Soto et al., 2003). Blum et al., (2000) encontraram níveis aumentados de ON em vacas com mastite, o ON é um radical livre e participa de processos fisiológicos como a inflamação e implantação embrionária (Lima-Verde, et al., 2007), este radical pode bloquear o desenvolvimento embrionário pela ativação da apoptose (Soto et al., 2003), infusão de ON em camundongas causou a inibição da implantação embrionária de maneira dose-dependente (Barroso 2005).

A presença de agentes na glândula mamária pode desencadear uma cascata inflamatória e consequentemente aumentar a produção de PGF2 α , que pela lise do CL impede a manutenção da gestação. Esta cascata seria iniciada em resposta a liberação do LPS das membranas das bactérias gram-negativas (Hansen et., 2004). As bactérias gram-positivas possuem outro componente de membrana, o ácido lipoteicóico ou ácido teicóico (ALT), que pode afetar a fertilidade de maneira semelhante ao LPS, infusão de ALT foi capaz de induzir aborto em camundongas (Kajikawa et al., 1998). Independentemente de qual mecanismo esteja envolvido, no presente estudo é mostrado que os agentes causadores de mastite e a alta CCS exercem efeito deletério sobre a fertilidade de vacas leiteiras receptoras de embrião.

5. Conclusão

O uso de uma única análise de CCS por animal pode não ser um parâmetro eficaz para detectar IIM já que a Se. e Sp. foram baixas nos limiares estudados. CCS elevada e infecção intramamária reduzem a P/TE de receptoras de embrião em lactação.

6. Referências

ANDERSEN, S., I. R. DOHOO, R. OLDE RIEKERINK, H. STRYHN. Diagnosing intramammary infections: Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2966-2975, 2010.

BARKER, A. R., F. N. SCHRICK, M. J. LEWIS, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1285-1290, 1998.

BARROSO, R.P. Avaliação dos efeitos do óxido nítrico no desenvolvimento de embriões de camundongos in vitro e in vivo. Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia, para a obtenção do título de Mestre, em 8 de julho de 2005.

BLUM J.W., H. DOSOGNE, D. HOEBEN, F. VANGROENWEGHE, H.M. HAMMON, R.M. BRUCKMAIER, C. BURVENICH. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 19, p. 223-235, 2000.

BRADLEY, A. J., K. A. LEACH, J. E. BREEN, L. E. GREEN, M. J. GREEN. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, v. 160, p. 253-257, 2007.

BUTLER, W. R. 1998. Influence of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2533-2539 1998.

DOHOO, I. R., J. SMITH, S. ANDERSEN, D. F. KELTON, S. GODDEN. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of Dairy Science*, v. 94, 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, p. 225–237, 1991.

EALY, A. D., M. DROST, P. J. HANSEN. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2899–2905, 1993.

GOLDBERG, J. J., E. E. WILDMAN, J. W. PANKEY, J. R. KUNKEL, D. B. HOWARD, B. M. MURPHY. The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 96–104, 1992.

HANSEN P. J, P. SOTO, R.P. NATZKE. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in pregnancy mortality. *American Journal Reproductive Immunology*, v. 51, p. 294 –301, 2004.

HARRIS, B. L. & E. S. KOLVER. Review of holsteinization on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, v.84 (E Suppl.), p. E56–E61, 2001.

HERATH, S., E. J. WILLIAMS, S. T. LILLY, R. O. GILBERT, H. DOBSON, C. E. BRYANT, I. M. SHELDON. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, v. 134, p.683–693, 2007.

HERTL, J. A., Y. T. GROHN, J. D. G. LEACH, D. BAR, G. J. BENNETT, R. N. GONZALEZ, B. J. RAUCH, F. L. WELCOME, L. W. TAUER, Y. H. SCHUKKEN. Effects of clinical mastitis caused by grampositive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 1551–1560, 2010.

HOCKETT M.E., ALMEIDA R.A., ROHRBACH N.R., OLIVER S.P., DOWLEN H.H., SCHRICK F.N. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2422–2431, 2005.

HOCKETT M. E., F. M .HOPKINS, M. J. LEWIS, A. M. SAXTON, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER, F.N. SCHRICK. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 241–251, 2000.

HUDSON, C. D., A. J. BRADLEY, J. E. BREEN, M. J. GREEN. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3683-3697, 2012.

KAJIKAWA, S., N. KAGA, Y. FUTAMURA, C. KAKINUMA, Y. SHIBUTANI. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. *Journal of Pharmacological Toxicological Methods*, v. 39, p. 147–154, 1998.

KANEENE, J. B., R. MILLER. Epidemiological study of metritis in Michigan dairy cattle. *Veterinary Research*, v. 25, p. 253–257, 1994.

LAVENS H., H. DeLUYKER, Y. H. SCHUKKEN, L. De MEULEMEESTER, R. VANDERMEERSCH, E. De MUELENAERE, A. De KRUIF. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 3219–3226, 1997.

LAVON, Y., EZRA, E., LEITNER, G., WOLFENSON, D. Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4538– 4545, 2011.

LIMA-VERDE I. B., J. B. BRUNO, M. H. T. MATOS, A. P. R. RODRIGUES, J. R. FIGUEIREDO, M. A. L. OLIVEIRA, P. F. LIMA. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. *Medicina Veterinária Recife*, v. 1, p.81-88, 2007.

LeBLANC, S. J., T. F. DUFFIELD, K. E. LESLIE, K. G. BATEMAN, G. P. KEEFE, J. S. WALTON, W. H. JOHNSON. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2223–2236, 2002.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will end? *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1277–1293, 2001.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction*, v. 61, p. 415–427, 2003.

MAPLETOFT R. J.: *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) 2006.

MOORE, D. A., M. W. OVERTON, R. C. CHEBEL, M. L. TRUSCOTT, R. H. BONDURANT. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 226, p. 1112–1118, 2005.

NMC Newsletter "Udder Topics", August, 2000, Excerpted from the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs "Animal Health News, v. 7, n. 4, December 1999.

PEREIRA, M. H. C., R.F. COOKE , A. A. ALFIERI, J. L. M. VASCONCELOS. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. *Animal Reproduction Science*, v. 137, p. 156-162, 2013.

PHILPOT, W. N & S. C. NICKERSON *Mastitis: Counter Attack*. Naperville: Babson Bros, p. 150, 1991.

PINEDO, P. J., P. MELENDEZ, J. A. VILLAGOMEZ-CORTES, C. A. RISCO. Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 1575–1580, 2009.

PUTNEY D. J., S. MULLINS, W.W. THATCHER, M. DROST, T.S. GROSS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 19, p. 37–51, 1988.

QUINN, P. J., B. K. MARKEY, M. E. CARTER, W. J. DONELLY, F. C. LEONARD. *Microbiologia Veterinaria e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SANTOS, J. E. P., R. L. A. CERRI, M. A. BALLOU, G. E. HIGGINBOTHAM, J. H. KIRK. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 31-45, 2004.

SAS, 2001. *SAS/STAT® User's Guide* (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

SCHEPERS A. J., T. J. LAM, Y. H. SCHUKKEN, J. B. WILMINK, W. J. HANEKAMP. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters, *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1833–1840, 1997.

SCHRICK, F. N., M. E. HOCKETT, A. M. SAXTON, M. J. LEWIS, H. H. DOWLEN, S. P. OLIVER.. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1407–1412, 2001.

SCHUKKEN, Y. H., D. J. WILSON, F. WELCOME, L. GARRISON-TINOFISKY, R. N. GONZALES. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, v. 34, p. 579-596, 2003.

SCHWARZ, D., U. S. DIESTERBECK, K. FAILING, S. KONIG, K. BRUGEMANN, M. ZSCHOCK, W. WOLTER, C. P. CZERNY. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany –A longitudinal study. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 5716–5728, 2010.

SMITH, K.L. & J.S. HOGAN. The world of mastitis. *Proc. 2nd Inter'l Symp. Mastitis and Milk Quality*, p. 1, 2001.

SOTO, P., R. P. NATZKE, P. J. HANSEN. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F_{2α} and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal Reproductive Immunology*, v. 50, p. 263–272, 2003.

WASHBURN, S. P., W. J. SILVIA, C. H. BROWN, B. T. MCDANIEL, A. J. MCALLISTER. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 244–251, 2002.

WILLIAMS, E. J., K. SIBLEY, A. N. MILLER, E. A. LANE, J. FISHWICK, D. M. NASH, S. HERATH, G. C. ENGLAND, H. DOBSON, I. M. SHELDON. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 60, p. 462–473, 2008.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

Considerações Gerais e Implicações

A mastite é uma das doenças mais prevalentes nos rebanhos leiteiros brasileiros, levantamento do laboratório VidaVet mostrou isolamento de agentes causadores de mastite em 70% das amostras analisadas. Cassoli (2013) mostraram que 23% dos produtores não atendem as exigências do governo para qualidade e produzem leite com CCS acima de 600.000 céls./ml. O presente estudo mostrou que CCS alta e infecções intrmamárias (IIM) podem ser responsáveis por diminuição da fertilidade. O correto controle da mastite pode influenciar diretamente a lucratividade das propriedades aumentando a produção por dia de intervalo entre partos. Programas de controle baseado apenas na CCS podem não ser totalmente eficazes já que parte dos animais que apresentam CCS baixa também podem apresentar IIM.

Dessa forma, as implicações práticas deste estudo são:

- 1- O uso de uma única análise de CCS por animal pode não ser um parâmetro eficaz para detectar IIM .
- 2- Agentes causadores de mastite podem ser isolados em amostras de leite independentemente da CCS.
- 3- Vacas com CCS alta ou IIM apresentam P/TE reduzida.