

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RELAÇÃO ENTRE HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA E
INDICADORES ENERGÉTICOS NA APRESENTAÇÃO DE
AFECÇÕES UTERINAS E DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO
PERIPARTO DE VACAS LEITEIRAS**

GABRIEL SOBIERAYSKI ESNAOLA

PORTO ALEGRE

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RELAÇÃO ENTRE HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA E
INDICADORES ENERGÉTICOS NA APRESENTAÇÃO DE
AFECÇÕES UTERINAS E DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO
PERIPARTO DE VACAS LEITEIRAS**

Autor: Gabriel Sobierayski Esnaola

Dissertação de mestrado apresentada como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Félix Hilário Diaz
González

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Sobierayski Esnaola, Gabriel
RELAÇÃO ENTRE HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA E
INDICADORES ENERGÉTICOS NA APRESENTAÇÃO DE AFECÇÕES
UTERINAS E DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO PERIPARTO DE VACAS
LEITEIRAS / Gabriel Sobierayski Esnaola. -- 2016.
51 f.

Orientador: Félix Hilário Diaz González.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. mastite clínica . 2. mastite subclínica. 3.
metrite. 4. hipocalcemia subclínica. 5. cetose
subclínica. I. Hilário Diaz González, Félix, orient.
II. Título.

GABRIEL SOBIERAYSKI ESNAOLA

RELAÇÃO ENTRE HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA E INDICADORES ENERGÉTICOS
NA APRESENTAÇÃO DE AFECÇÕES UTERINAS E DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO
PERIPARTO DE VACAS LEITEIRAS

Aprovado em 28 de março de 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix Hilário Diaz González

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Raquel Raimondo (UFRGS)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Bondan (UPF)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Márcio Nunes Correa (UFPEL)

Membro da Comissão

Dedico este trabalho a meus familiares
pelo apoio e compreensão durante
o período de seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, o apoio de vocês é o combustível para alcançar minhas conquistas.

Agradeço a minha esposa Ju pelo companheirismo de sempre. Sua alegria foi certamente o que fez superarmos juntos os momentos difíceis desse trabalho. Agradeço sua compreensão pelos momentos que estive ausente durante o período de execução do trabalho.

Agradeço a equipe da Fazenda Santo Isidoro pela grande ajuda e empenho nas coletas de dados.

Agradeço ao proprietário Fernando Stedile por disponibilizar os animais e pelo apoio nessa jornada.

Agradeço ao professor Félix pela orientação e pela oportunidade da realização desse projeto.

Agradeço as parcerias das empresas Ouro Fino, Bayer e Tortuga/DSM por acreditarem nesse projeto.

Agradeço as equipes dos laboratórios SARLE UPF, Sani, Diavet e Preventiva UFRGS pela dedicação no processamento das amostras deste estudo.

Agradeço a minha cunhada Bruna pela grande contribuição neste trabalho.

Agradeço ao meu amigo Waldemir pelo empenho e contribuição na análise dos dados.

Agradeço a minha cunhada Dani pela imensa parceria e disponibilidade em todas as fases desse projeto, que foram fundamentais para o resultado final.

Agradeço a Nati e ao Mig pela parceria e pela fonte de inspiração para a minha persistência na execução desse projeto.

O meu sincero agradecimento a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho: obrigado!

Há muitas maneiras de avançar, mas
só uma maneira de ficar parado.

Franklin D. Roosevelt

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo relacionar os níveis de indicadores sanguíneos energéticos e de cálcio na ocorrência de afecções uterinas, mastite clínica e mastite subclínica em vacas de raça Holandesa. A presença de mastite foi monitorada através do California Mastitis Test (CMT) e da contagem de células somáticas, para a identificação de mastite subclínica, e do Teste da Caneca de Fundo Preta (TCFP), para identificação de mastite clínica. A presença das afecções uterinas foi identificada mediante exame clínico. Foram feitas coletas de sangue para a determinação dos níveis de cálcio (Ca), glicose e β -hidroxi-butilato (BHB). O CMT foi realizado nas duas primeiras semanas após o parto, o TCFP foi realizado conforme a rotina de ordenha, estabelecida pela propriedade, e as coletas de sangue foram realizadas na semana anterior ao parto e duas coletas até os 21 dias posteriores ao parto. A ocorrência de hipocalcemia subclínica foi determinada quando o Ca no soro atingiu valores $\leq 8,00$ mg/dL, hipoglicemia com valores de glicose ≤ 50 mg/dL e hiperetonemia com valores de BHB $\geq 1,2$ mmol/L. Nas vacas com mastite clínica foi realizado tratamento conforme estabelecido pelo protocolo de ordenha e tratamentos da fazenda. Os dados de mastite subclínica obtidos através do teste de CMT, por quarto mamário, foram validados através de cultura microbiológica realizada em laboratório de referência e em laboratório na fazenda para identificar crescimento bacteriano, bem como através da contagem de células somáticas (CCS) e da contagem bacteriana total (CBT). Não foi encontrada relação significativa entre a hipocalcemia subclínica, a hipoglicemia e a hiperetonemia com afecções uterinas e da glandula mamária nas vacas após o parto.

Palavras-chave: mastite clínica; mastite subclínica; hipocalcemia subclínica, hipoglicemia, cetose subclínica.

ABSTRACT

This study aimed to relate the levels of energy and calcium in the occurrence of both uterine diseases, clinic and subclinic mastitis in Holstein cows. The presence of mastitis was monitored through California Mastitis Test (CMT) and the counting of somatic cells (CSC), for the identification of subclinic mastitis, and strip cup test, for the identification of clinic mastitis. The presence of uterine disorders was identified by clinical examination. Blood collections were made for determining calcium, glucose and β -hydroxy-butyrate (BHB). CMT was realized in the first two weeks after calving, BBMT was realized according to the routine of milking settled by the farm and the blood collections were made in the week before the calving and also two collections were made after it. The occurrence of subclinic hypocalcemia was determined when serum Ca reached $\leq 8,00$ mg/dL, hypoglycemia with glucose values ≤ 50 mg/dL and hyperketonemia values with BHB $\geq 1,2$ mmol/L. Data of clinic mastitis were obtained through the identification of altered milk in BBMT and subsequently realized treatment as settled by the milking protocol and treatments of the farm. Data of subclinic mastitis were obtained through CMT test, for mammary quarter, and validated by microbiological culture in reference laboratory, culture in the farm for identifying the bacterial growth, counting of somatic cells (CSC) and total bacterial counting (TBC). It was not identified in the study any relationship between subclinical hypocalcemia and uterine and mammary gland diseases in cows after calving.

Key-words: mastitis; subclinical mastitis; subclinical hypocalcemia; hypoglycemia; subclinical ketosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cinética do cálcio no periparto de vacas leiteiras (adaptado de Corbellini, 1998). 17
- Figura 2. Influência do número de lactações sobre a incidência de hipocalcemia puerperal (adaptado de Curtis, 1984). 17
- Figura 3. Consequências da hipocalcemia subclínica (adaptado de Mulligan et al., 2006). 18
- Figura 4. Concentrações de cortisol plasmático em vacas periparturientes (adaptado de Jorgensen, 1982). 20
- Figura 5. Evolução dos valores de β -hidroxi-butirato (BHB), níveis de glicose, temperatura retal, escore de condição corporal (ECC) e contagem de leucócitos e neutrófilos entre os grupos. 32
- Figura 6. Distribuição das médias e desvio padrão do número de lactação entre os grupos do estudo 33
- Figura 7. Distribuição das médias e desvio padrão da produção de leite nos primeiros 60 dias em lactação entre os grupos do estudo..... 33
- Figura 8. Distribuição das frequências nas amostras positivas no cultivo e identificação bacteriana na mastite subclínica..... 38
- Figura 9. Frequência dos resultados microbiológicos entre os testes do laboratório oficial (LAB) e análises realizadas em cultivo na fazenda (FAZ) 39
- Figura 10. Relação entre a CBT média e faixas de valores da CCS. Diferença estatística está representada pela diferença entre as letras a e b através do teste de Tukey ($p < 0,05$). 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dieta oferecida no período de 25 dias anterior ao parto	25
Tabela 2. Ocorrência de patologias e descartes prematuros do rebanho no período do estudo	34
Tabela 3. Incidência dos transtornos metabólicos subclínicos entre os grupos.....	34
Tabela 4. Medidas descritivas do BHB entre os grupos ao longo das coletas.....	34
Tabela 5. Medidas descritivas da ECC entre os grupos ao longo das coletas	35
Tabela 6. Medidas descritivas do cálcio entre os grupos ao longo das coletas	35
Tabela 7. Medidas descritivas da glicose entre os grupos ao longo das coletas.....	35
Tabela 8. Medidas descritivas da temperatura entre os grupos ao longo das coletas	36
Tabela 9. Medidas descritivas dos leucócitos entre os grupos ao longo das coletas	36
Tabela 10. Medidas descritivas dos neutrófilos entre os grupos ao longo das coletas ...	36
Tabela 11. Comparação da distribuição da ordem de parto através da média e variação do número de lactações e produção diária média entre os grupos de estudo	37
Tabela 12. Amostras positivas no teste microbiológico entre os laboratórios.....	39
Tabela 13. Análises de leite por quarto mamário em amostras com diagnóstico positivo de mastite subclínica no teste do CMT	40
Tabela 14. Correlação de Pearson entre os testes de mastite subclínica identificados por quartos mamários	41
Tabela 15. Dieta formulada através do programa Spartan 3 para os animais em lactação.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	METABOLISMO DO CÁLCIO.....	15
	CONTROLE ENERGÉTICO	18
	IMUNOSSUPRESSÃO	19
	AFECÇÕES UTERINAS.....	20
	MASTITE.....	21
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
	ANIMAIS, ALOJAMENTO E DIETA	24
	ECC, PRODUÇÃO DE LEITE E DESCARTE PREMATURO DO REBANHO.....	25
	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE AFECÇÕES UTERINAS	26
	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA.....	26
	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE MASTITE SUBCLÍNICA.....	26
	COLETA DE SANGUE E ANÁLISES.....	27
	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5	RESULTADOS	29
	PRODUÇÃO MÉDIA E DESCARTE PREMATURO DO REBANHO	31
	IDENTIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA	37
	CULTURA MICROBIOLÓGICA.....	38
	CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DA MASTITE SUBCLÍNICA	39

6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	ANEXO A.....	51

INTRODUÇÃO

O período de transição das vacas leiteiras compreende as três semanas anteriores e três semanas posteriores ao parto (GRUMMER, 1995). Nesse período os animais passam por importantes alterações metabólicas e endócrinas em resposta fisiológica aos mecanismos do parto, podendo o consumo atingir decréscimos de 25-35% de matéria seca (MS) nas últimas três semanas em relação ao parto (DRACKLEY, 1999) e um declínio de até 88,9% na semana que antecede o parto (HAYIRLI et al., 2002). O parto e o início da lactação impõem grandes desafios fisiológicos para o balanço energético e do cálcio (Ca) sendo a imunossupressão uma característica comum (RISCO; RETAMAL, 2011).

A hipocalcemia clínica é uma alteração metabólica decorrente da súbita mudança na demanda de Ca dos compartimentos corporais para suprir a produção de colostro e o início da lactação. Essa alteração metabólica é regulada por mecanismos compensatórios: o aumento da absorção intestinal, reabsorção renal e a mobilização óssea do Ca. No entanto, quando os mecanismos de regulação falham, os animais podem desenvolver manifestações clínicas nas primeiras 72 horas após o parto (CORBELLINI, 1998). A hipocalcemia subclínica é menos grave para a saúde do animal, mas causa uma diminuição na produtividade do rebanho e reduz o consumo de matéria seca no início da lactação (GOFF, 2006). Estudos apontam que a hipocalcemia subclínica torna as vacas mais susceptíveis a doenças secundárias como: síndrome da vaca caída, distocia, redução no desempenho reprodutivo, retenção de placenta, metrite (MARTINEZ et al., 2012) e deslocamento do abomaso (CHAPINAL et al., 2011). A hipocalcemia reduz a capacidade de resposta das células do sistema imunológico aos estímulos (KIMURA, et al., 2006; MARTINEZ et al., 2014) contribuindo assim para ocorrência de infecções. A incidência da hipocalcemia subclínica demonstrou ter prevalência de 25-54% dependendo do número de lactações (REINHARDT, et al., 2011).

O início da lactação em vacas de alta produção leiteira impõe aumento nos requerimentos de glicose, aminoácidos e ácidos gráxos que não podem ser atingidos pela ingestão dieta. Evidenciado pelo aumento acentuado na mobilização dos ácidos graxos e um aumento importante na gliconeogênese hepática (BELL, 1995).

As infecções do úbere são comuns no início da lactação e apresentam grande impacto econômico na indústria leiteira. Os benefícios econômicos da identificação e

eliminação das infecções no início de lactação são relevantes, incluindo a prevenção de mastite clínica, diminuindo leite descartado e reduzindo a contagem de CCS do reservatório de leite (DINGWELL et al., 2003). Estudos têm considerado o monitoramento da saúde do úbere após o parto como oportunidades de intervenção que incluem o tratamento, a segregação e o descarte dos animais afetados. (SARGEANT, et al., 2001; SCHUKKEN, et al., 2002; ANDERSON et al., 2010)

A saúde uterina é muitas vezes comprometida em bovinos devido à contaminação do lúmen uterino após o parto por bactérias oportunistas e patogênicas que frequentemente persistem causando doença clínica. A infertilidade associada com infecção uterina envolve efeitos indiretos com perturbação do hipotálamo, glândula pituitária e dos ovários que tendem a persistir mesmo depois de resolução clínica da doença (SHELDON; DOBSON, 2004).

Um terço de vacas leiteiras podem ser afetadas por alguma forma de doença metabólica ou infecciosa no início da lactação (LEBLANC, 2010). Através da manipulação da dieta e medidas adequadas de manejo durante o final da gestação, é possível reduzir a níveis mínimos a incidência dos distúrbios metabólicos com o potencial de aumentar a produção subsequente, elevar a produção de leite, promover a saúde e a eficiência reprodutiva do rebanho (EAN; DEGARIS, 2009).

O presente estudo teve como propósito elucidar a importância da monitoria dos transtornos metabólicos sobre a saúde dos animais de um rebanho leiteiro em sistema de criação a pasto. Foi atribuída especial atenção às afecções uterinas em razão da estreita relação do ambiente uterino com a capacidade de conceber na lactação subsequente, assim como da glândula mamária, em razão da síntese de nutrientes e proteção ao neonato, capacidade produção de leite e qualidade do leite destinado ao consumo humano.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em razão do parto e início da lactação as vacas leiteiras passam por um período de resistência à insulina, ingestão de alimentos reduzida, balanço energético negativo, hipocalcemia, redução da função imune e contaminação bacteriana do útero após o parto (LEBLANC, 2010). A incidência de doenças metabólicas geralmente aumenta à medida que a produção de leite e o tamanho dos rebanhos aumenta, tornando necessária uma rigorosa monitorização rebanhos para quantificar doenças metabólicas (OETZEL, 2004).

A utilização de perfis metabólicos em vacas leiteiras foram usados inicialmente na Inglaterra na década de 1960 (PAYNE, 1970). A monitoria do perfil metabólico é uma ferramenta prática encontrada para a gestão nutricional combinada com avaliações dos animais, instalações, condição corporal e consumo da dieta (SAUN, VAN, 2005). Métodos de detecção precoce incluem o monitoramento de registros de doenças, descarte prematuros, consumo da dieta, produção de leite, condição corporal e testes metabólicos. A monitoria de incidência das patologias inclui o número de bovinos que tiveram distocia, retenção das membranas fetais, hipocalcemia, metrite, mastite e deslocamento de abomaso ou que foram descartados ou morreram no início da lactação, dividido pelo número de vacas que pariram em um período de tempo definido (LEBLANC, 2010).

O escore de de condição corporal (ECC) fornece uma estimativa rápida de estimar o depósito de gordura corporal subcutânea e reflete o estado nutricional e metabólico dos animais (EDMONSON et al., 1989). O aumento da produção de leite no início da lactação é um indicador de uma boa saúde e consumo de dieta (LEBLANC, 2010). A monitoria do consumo do alimento mensurado em kg de MS seria uma ferramenta útil para rastrear as vacas para o risco de doença no período de transição (HUZZEY et al., 2007), ainda que a aplicação seja limitada em rebanhos com acesso livre ao alimento, sendo observado um consumo médio de um lote de animais e não de forma individualizada.

METABOLISMO DO CÁLCIO

Com o início da lactação, as exigências de Ca aumentam drasticamente, pois sua concentração no colostro é quase duas vezes superior às do leite. Logo após o parto, uma vaca produzindo cerca de 10 kg de colostro, irá eliminar cerca de 23 g de Ca em uma única ordenha. Isso equivale de oito a dez vezes a quantidade total de cálcio sanguíneo

em uma vaca de 600 kg (SANTOS; SANTOS, 1998). Somadas as perdas fecais e urinárias de cálcio, somente é possível manter o fluxo de Ca do líquido extracelular (70- 90 g/dia) através de uma maior eficiência na absorção intestinal e/ ou aumento da mobilização óssea (Figura 1) (CORBELLINI, 1998).

O Ca é um componente essencial para a formação dos ossos, contrações musculares, transmissão nervosa, fatores de coagulação e participa na regulação da ação de vários hormônios como segundo mensageiro (HORST, 1986). A concentração plasmática de Ca é normalmente mantida acima de 2,0 e 2,6 mmol/L (8,0-10,4 mg/dL) (GOFF, 2008). Praticamente todas as vacas leiteiras passam por uma hipocalcemia subclínica no início de lactação, devido às despesas de cálcio pela glândula mamária, apresentando valores inferiores a 1,8 mmol/L (7,5 mg/dL) nas primeiras 24 h após o parto (RADOSTITS et al., 2007). Em alguns animais a hipocalcemia pode ser mais severa, atingindo níveis inferiores a 1,25 mmol/L (5,0 mg/dL), o que acarreta disfunções neuromusculares. A progressiva perda das funções musculares, colapso circulatório e depressão da consciência, são manifestações da hipocalcemia clínica (RADOSTITS et al., 2007). Se não houver tratamento, os níveis podem continuar declinando até 0,5 mmol/L (2 mg/dL), sendo incompatível com a vida e podendo levar o animal a óbito (GOFF, 2000). O fósforo também sofre alteração na sua concentração durante a hipocalcemia, fato que contribui para ocorrência dos sinais clínicos. Alguns casos de hipocalcemia podem não responder ao tratamento, mesmo que os níveis de cálcio já tenham retornado aos valores normais. Nesses casos é indicado o uso da combinação de fosfato de sódio e sais de cálcio no tratamento (RADOSTITS et al., 2007). A análise retrospectiva de estudos realizados entre 1977 e 2009 mostra que a incidência de hipocalcemia clínica em vacas leiteiras nos EUA foi de 3,45% (variando de 0-7%), na Europa foi de 6,17% (variando de 0-10%) e na Austrália foi de 3,5% (variando de 0-7%) (EAN; DEGARIS, 2009).

A hipocalcemia após o parto tem correlação com a idade, tornando-se marcante a partir da 3ª lactação. A ocorrência na 1ª lactação é incomum (Figura 2) (CURTIS; SNIFFEN; SMITH, 1984). Esse aumento no risco de sofrer hipocalcemia é associado com a diminuição da capacidade para mobilizar cálcio dos ossos e possivelmente uma redução do número de receptores de 1,25-dihidroxi-colecalciferol no intestino (GOFF et al., 1989).

Investigações demonstram que certas raças bovinas são mais suscetíveis à hipocalcemia puerperal, particularmente Channel Island, Swedish Red and White, Norwegian e vacas Jersey (LEAN, et al., 2006). Vacas Jersey possuem 15% menos receptores para vitamina D no intestino, quando comparadas com vacas da raça Holandesa, o que dificulta a absorção de cálcio após o parto (GOFF, 2000).

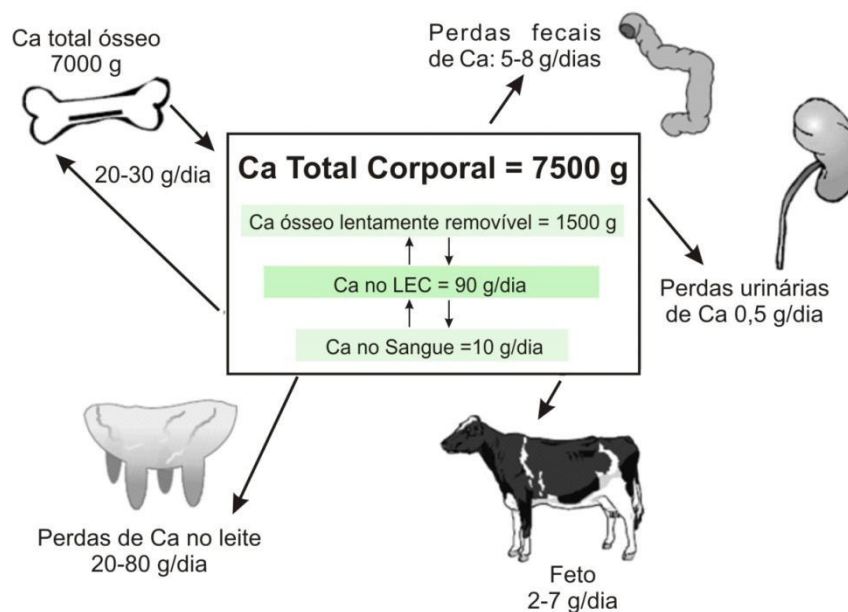


Figura 1. Cinética do cálcio no periparto de vacas leiteiras (adaptado de Corbellini, 1998).

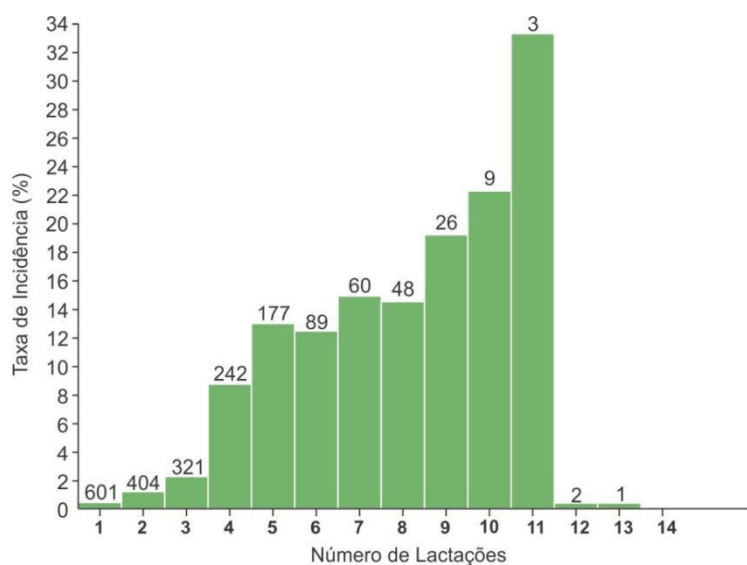


Figura 2. Influência do número de lactações sobre a incidência de hipocalcemia puerperal no rebanho (adaptado de Curtis, 1984).

A hipocalcemia acarreta perdas associadas ao aumento da ocorrência de outras alterações como a retenção de placenta, deslocamento de abomaso, metrites, mastites e cetose (MULLIGAN et al., 2006), o que evidencia a importância das estratégias para a prevenção da hipocalcemia puerperal (Figura 3). Quando o risco de ocorrência de hipocalcemia puerperal atinge cerca de 10%, em vacas de terceira ou mais lactações, um programa específico de controle é necessário (RADOSTITS et al., 2007).

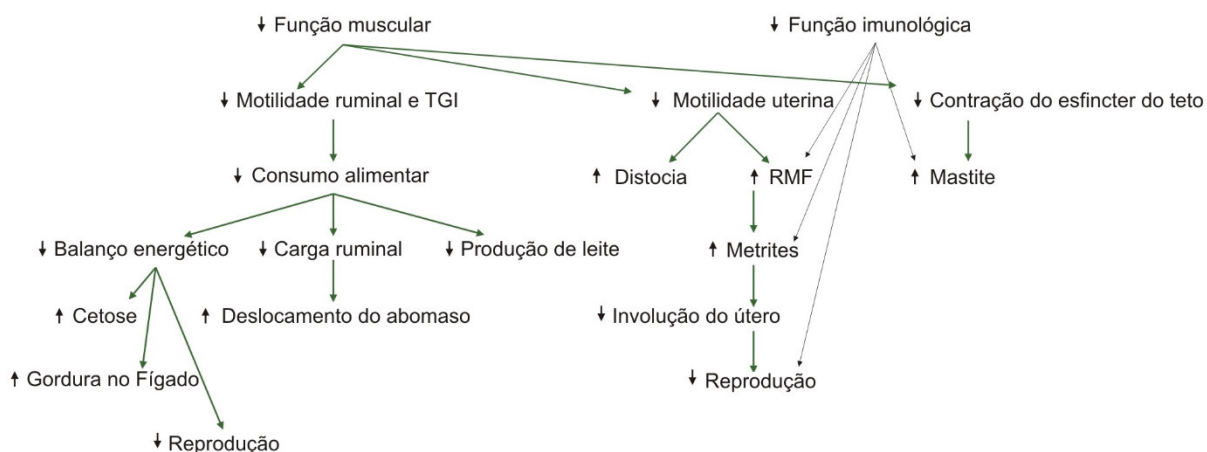


Figura 3. Consequências da hipocalcemia subclínica (adaptado de Mulligan et al., 2006).

CONTROLE ENERGÉTICO

A demanda de energia e nitrogênio no final da gravidez para o feto são atendidas por captação placentária de glicose e aminoácidos maternos, resultando em aumento de 30 a 50 % os requerimentos maternos, através do aumento da ingestão voluntária e adaptações metabólicas maternas. O útero grávido oxida glicose, como combustível metabólico primário enquanto a glândula mamária converte a glicose em lactose, sendo determinante da produção de leite (BELL, 1995).

A demanda de energia após o parto para a produção do leite é superior a ingestão de alimentos em razão da taxa diminuída de consumo de matéria seca (OVERTON; WALDRON, 2004). A adaptação na homeostasia do metabolismo da glicose para a síntese de lactose glândula mamária torna-se dependente do aumento concomitante da gliconeogênese hepática e diminuição da oxidação de glicose dos tecidos periféricos (BELL, 1995). Enquanto que adaptação metabólica dos lipídeos aumenta a mobilização de reservas de gordura corporal para atender às exigências energéticas da vaca durante um período de balanço energético negativo (BEN) no início da lactação (OVERTON;

WALDRON, 2004). Aumentos significativos na mobilização de lipídeos podem predispor vacas leiteiras a transtornos metabólicos e doenças infecciosas (CONTRERAS; SORDILLO, 2011).

A hipocalcemia interfere na secreção de insulina, diminuindo a utilização da glicose pelos tecidos. Devido a isto, eleva-se a mobilização de lipídeos após o parto, com valores elevados de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e BHB durante os 12 dias após o parto (GOFF; HORST, 1997; MARTINEZ et al., 2012). Vacas com escore de condição corporal elevado (ECC > 3,5 em uma escala de um até cinco) são mais propensas a desenvolver hipocalcemia (VANDEHAAR et al., 1999) e cetose (OVERTON; WALDRON, 2004).

IMUNOSSUPRESSÃO

Vários fatores são propostos para explicar a redução na função do sistema imunológico associados ao aumento da demanda metabólica, incluindo redução das reservas de glicogênio, aumento de AGNE e BHB (GALVÃO et al., 2010) e diminuição do cálcio ionizado sanguíneo (Ca^{2+}) (HORST et al., 1997; KIMURA et al., 2002). O impacto direto que o estresse metabólico exerce sobre as funções do sistema imunológico no momento do parto foi claramente demonstrado utilizando vacas mastectomizadas como modelo. Neste estudo, as vacas foram mastectomizadas no final da gestação para avaliar as mudanças associadas com o sistema endócrino no momento do parto, excluindo os efeitos da produção de leite e BEN sobre a imunidade (KIMURA; GOFF; KEHRLI, 1999).

O cortisol apresenta concentrações plasmáticas elevadas em vacas que desenvolvem hipocalcemia puerperal (Figura 4) (HORST; JORGENSEN, 1982). As altas concentrações podem exacerbar a imunossupressão geralmente presente no pós-parto (GOFF; HORST, 1997). A hipocalcemia reduz a capacidade das células do sistema imunológico em responder a estímulos (GOFF; KIMURA, 2002), isto pode contribuir para a ocorrência de infecções, como mastite e infecções uterinas.

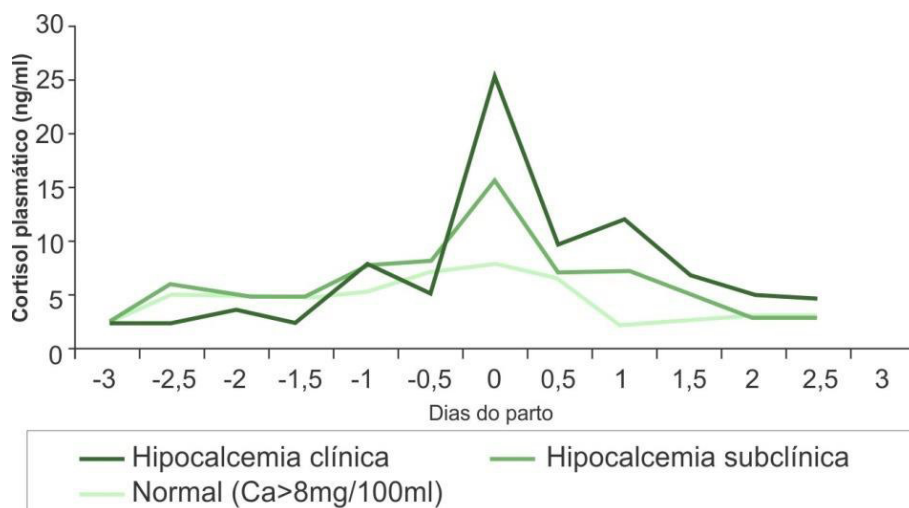


Figura 4. Concentrações de cortisol plasmático em vacas periparturientes (adaptado de Jorgensen, 1982).

AFECÇÕES UTERINAS

O útero de vacas leiteiras após o parto é susceptível a múltiplos agentes patogênicos bacterianos, essa susceptibilidade parece estar associada com a imunossupressão do periparto e estado energético do animal. Os neutrófilos desempenham um papel importante, pois são a primeira linha de defesa celular contra a colonização bacteriana uterina (BONNETT; MARTIN; MEEK, 1993). A metrite puerperal pode ser definida quando existe aumento do conteúdo uterino e uma descarga anormal uterina, de coloração vermelho-acastanhada, associado com sinais de doença sistêmicos (redução da produção de leite, anorexia, depressão, septicemia ou toxemia e febre acima de 39,5°C) até 21 dias após o parto. Os animais que não apresentam sinais de doença sistêmica, mas apresentam aumento do volume uterino e descarga purulenta na vagina, até os 21 dias após o parto, recebem o diagnóstico de metrite clínica. A endometrite clínica é caracterizada pela descarga uterina purulenta detectada na vagina, após 21 dias do parto, ou descarga mucopurulenta detectada na vagina após 26 dias do parto (BONNETT; MARTIN; MEEK, 1993); (LEBLANC et al., 2002). O diagnóstico da endometrite subclínica é realizado através da contagem de neutrófilos, superior a 18% na citologia uterina, quando coletados entre 21-33 dias após o parto (HAMMON et al., 2006), ou mais de 10% de neutrófilos quando coletados entre 34-47 dias após o parto (KASIMANICKAM et al., 2004). A piometra é definida pelo acúmulo de material no lúmen uterino, na presença de corpo lúteo persistente e cérvix fechada (SHELDON et al., 2010).

Em estudo que isolou o efeito de complicações do parto, foi atribuído alto risco de desenvolver metrite aos animais que apresentaram quadros de distocia, partos gemelares, natimortos, retenção de placenta ou essas complicações combinadas após o parto. Os animais que não apresentaram esses fatores de risco formaram o grupo de baixo risco de desenvolver metrite. A redução na concentração e atividade dos neutrófilos no sangue e foi atribuída aos baixos níveis de cálcio e ao balanço energético negativo no período após o parto. Os animais hipocalcêmicos também apresentaram redução na taxa de gestação e aumento nos dias abertos (MARTINEZ et al., 2012).

A hipocalcemia subclínica apresenta associação significativa com a incidência de metrite, endometrite e retenção das membranas fetais (REINHARDT et al., 2011). A hipocalcemia anterior ao parto pode resultar na inércia uterina predispondo a ocorrência de distocia e prolapso uterino (RADOSTITS et al., 2007). Estudos indicam que a probabilidade de ocorrer distocia aumenta em 2,5 até 3 vezes, comparados com vacas normocalcêmicas (CORREA; ERB; SCARLETT, 1993).

Segundo um estudo realizado por Correa et al. (1993) a distocia aumenta a ocorrência de retenção das membranas fetais após as primeiras 24 horas em relação ao parto. Outro estudo reporta que vacas que desenvolveram retenção das membranas fetais apresentaram a função de neutrófilos prejudicada antes do parto, sugerindo como causa da falha do desprendimento da ligação das carúnculas e cotilédones após o parto (KIMURA et al., 2002).

A hipocalcemia reduz a fertilidade em vacas leiteiras afetando a função da musculatura uterina, o que prolonga o período de involução uterina. É reportado o aumento do número de inseminações por concepção e um aumento no intervalo entre o parto e a primeira inseminação em vacas com hipocalcemia (MARTINEZ et al., 2012). Há também efeitos indiretos da hipocalcemia na fertilidade, os quais são predispostos pelo aumento da ocorrência de distocia e retenção de placenta (MULLIGAN et al., 2006).

MASTITE

A fase da lactação marca o final do ciclo reprodutivo dos mamíferos, sendo a glândula mamária o órgão que provê nutrientes ao neonato e resistência a doenças através do leite. As secreções dos tecidos mamários apresentam componentes imunes celulares solúveis, importantes para a proteção da glândula mamária contra doenças infecciosas,

como a mastite. A mastite pode afetar todos os mamíferos lactantes, porém é especialmente problemática em rebanhos de bovinos leiteiros (SORDILLO; STREICHER, 2002). Em razão do volume de leite produzido pelos bovinos existe diluição de componentes de gordura e caseína, o que dificulta o recrutamento de fatores imunológicos de proteção (BURTON; ERSKINE, 2003).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária que pode ser causada por uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias Gram-positivas e gram-negativas, micoplasmas e algas. Muitas espécies microbianas que são causas comuns de mastite bovina, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* também podem ser comensais ou patógenos de humanos; enquanto que outras espécies causadoras, tais como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae* ou *Staphylococcus chromogenes* são encontradas quase exclusivamente em animais (ZADOKS; MIDDLETON, 2011).

Os trabalhos sugerem que aumento do risco de desenvolver mastite clínica, em vacas com hipocalcemia clínica, está associado ao resultado combinado do aumento da exposição do teto às bactérias ambientais, devido ao decúbito prolongado, ordenha interrompida (CURTIS et al., 1985) e da deficiência na função das células do sistema imune inato (KEHRLI et al., 1990).

O resultado do aumento da contagem de bactérias na secreção láctea de vacas que estão com leucopenia é acompanhado pela redução da resposta humoral e da função das células de defesa (KEHRLI ; GOFF, 1989) e acompanhado pelo aumento da ocorrência de mastite clínica (KEHRLI et al., 1990). Em estudos recentes, em vacas com hipocalcemia subclínica induzida, demonstram um declínio do Ca^{2+} no citosol de neutrófilos, o que provavelmente explica o comprometimento da fagocitose e da atividade oxidativa dessas células contra bactérias patogênicas (MARTINEZ et al., 2014).

O impacto global da mastite na qualidade e na quantidade de leite produzido para consumo humano fornece o ímpeto para melhor compreender a fisiopatologia da glândula mamária e desenvolver maneiras de melhorar a resistência a doenças através imunomoduladores (SORDILLO; STREICHER, 2002) e marcadores genéticos (PAAPE et al., 2002; VERBEKE et al., 2014), sendo a melhoria da função e resposta imunológica o caminho do êxito para reduzir os prejuízos da mastite no período do puerpério.

OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi de relacionar as concentrações do Ca do soro e os níveis energéticos sanguíneos de vacas leiteiras de alta produção com a apresentação de afecções uterinas (metrite) e mamárias (mastite) após o parto. A hipótese central é que a colonização e infecção do útero e da glândula mamária são facilitadas em vacas que desenvolvem hipocalcemia subclínica e balanço energético negativo, pois a ativação do metabolismo das células do sistema imune é dependente do cálcio e da energia metabólica. Com este trabalho pretende-se desenvolver estratégias de avaliar a saúde e o bem-estar dos animais no periparto.

Objetivos específicos:

- 1- Monitorar a incidência de transtornos metabólicos associados ao Ca e ao controle energético de vacas no período de transição.
- 2- Monitorar a incidência de afecções uterinas e da glândula mamária após o parto de vacas leiteiras.
- 3- Avaliar a eficiência de identificação de mastite subclínica através de cultura microbiológica realizada na fazenda quando comparado ao teste padrão de identificação bacteriana em laboratório de referência.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS, ALOJAMENTO E DIETA

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS (projeto nº 28158). O estudo foi realizado em uma propriedade rural de produção de leite no sul do Brasil com vacas da raça Holandesa criadas sob o regime de pastoreio com suplementação no cocho duas vezes ao dia (ANEXO A). O rebanho possuía 500 animais em lactação com produção de 8.500 kg de leite/vaca/ano. As observações foram coletadas no período de maio a outubro de 2015. Cento e trinta e três animais foram avaliados para calcemia, glicemia e cetonemia durante a última semana que antecede o parto e durante as três primeiras semanas após o parto, identificando a ocorrência de hipocalcemia quando o cálcio no soro $\leq 8,0$ mg/dL (GOFF, 2008), hipoglicemia quando glicose no soro foi inferior a 50 mg/dL e cetonemia quando o BHB no sangue foi superior a 1,2 mmol/L (MCART; NYDAM; OETZEL, 2012). As alterações metabólicas subclínicas foram relacionadas à apresentação de mastite, mastite subclínica e metrite. Os animais foram selecionados uma semana anterior ao parto através da estimativa da data de parto, considerando uma média de 283 dias de gestação, através do auxílio do programa de gerenciamento Delpro (DeLaval). Os animais eram alojados em piquetes de pré-parto com estimativa de 25 dias anterior ao parto, onde recebiam dieta duas vezes ao dia com a inclusão de sais aniônicos. As dietas dos animais foram estabelecida com o auxílio de programa de formulação Spartan 3 (Tabela 1). Os piquetes do pré-parto eram mantidos com roçadas programadas para que a ingestão de matéria seca provinda do pasto fosse restringida.

Tabela 1. Dieta oferecida no período de 25 dias anterior ao parto

Nome do alimento	MS kg	Alimento kg	MS %	% dieta % MS Ingerida	FDN %MS	ELL Mcal/kg	PC %MS	PNR %PC
Água	0	4	0,04	0,01	0	0	0	0
Palha de Trigo	4,93	5,6	88	40,3	80	0,79	5	33
Ração	2,8	3	93,24	22,88	15,5	1,75	31,6	59
Silagem de Milho	4,5	12,5	36	36,8	38	1,68	7,6	33

	MS kg/dia	Alimento kg/dia	MS %	% dieta %MS ingerida	FDN g/dia	ELL Mcal/kg	PC kg/dia	PNR kg/dia
Fornecido	12,23	25,1	48,7	100	6,1	16,3	1,47	0,71
Requerimento	12,26				3,7	17,1	1,43	0,59
Diferença	-0,03				2,4	-0,8	0,04	0,12

	FDN %MS	FDNef %MS	FDNfor %MS	ELL Mcal/kg	PC %MS	PM %MS	PDR %MS	PDRdig %MS
Fornecido	49,8	47,1	46,2	1,3	12,05	9,38	6,21	5,06
Requerimento	30	24	22,5	1,4	11,7	8,19	8,5	3,88
Diferença	19,8	23,1	23,7	-0,1	0,34	1,19	-2,29	1,18

	Amido %MS	Amido DR %Amido	AG %MS	CNF %MS	DCAD mEq/100g	Vit A kUI/kg	Vit D kUI/kg	Vit E UI/kg
Fornecido	17,33	61,02	2,18	29	-12,6	3,82	0,95	28,6
Requerimento					-10	6,1	1,66	87,5
Diferença					-2,6	-2,28	-0,71	-58,9

	Ca %MS	P %MS	Mg %MS	K %MS	Na %MS	Cl %MS	S %MS	Co ppm
Fornecido	0,86	0,37	0,26	1,54	0,29	0,4	0,21	0,28
Requerimento	0,77	0,37	0,2	1,08	0,23	0,26	0,21	0,11
Diferença	0,09	0	0,06	0,46	0,06	0,14	0	0,16

	Cu ppm	Fe ppm	I ppm	Mn ppm	Se ppm	Zn ppm
Fornecido	12,5	37	0,61	19	0,29	38
Requerimento	11,4	28	0,52	20	0,3	27
Diferença	1,1	10	0,09	-1	-0,01	11

Matéria seca (MS), porcentagem referente a dieta (% dieta), fibra detergente neutro (FDN), energia referente a lactação líquida (ELL), proteína crua (PC), proteína não degradada no rúmen (PNR), fibra detergente neutro efetivo (FDNef), fibra detergente neutro da forragem (FDNfor), proteína metabolizável (PM), proteína degradável no rúmen (PDR), proteína degradável no rúmen digestível (PDRdig), amido degradável no rúmen (Amido DR), ácidos graxos (AG), carboidratos não fibrosos (CNF), diferença cátion-anion da dieta (DCAD), vitamina A (Vit A), vitamina D (Vit D), vitamina E (Vit E), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl), enxofre (S), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe) iodo (I), manganês (Mn), selênio (Se), zinco (Zn).

ECC, PRODUÇÃO DE LEITE E DESCARTE PREMATURO DO REBANHO

O escore de condição corporal (ECC) dos animais foi avaliado no periparto seguindo uma escala de um até cinco (EDMONSON et al., 1989), avaliado sempre pelo mesmo veterinário. A produção de leite diária foi mensurada durante os primeiros 60 dias em lactação (DEL) pelo sistema de ordenha com balança que estima a produção individual dos animais (DeLaval, Brasil). A avaliação de descarte prematuro do rebanho ocorreu durante o período dos primeiros 60 dias em lactação (DEL).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE AFECÇÕES UTERINAS

Os animais selecionados foram provenientes de partos normais sem complicações como partos gemelares ou distócicos. As vacas foram submetidas a um exame físico completo, semanalmente durante os primeiros 21 dias pós-parto. A temperatura retal foi aferida através de termômetro digital, após a primeira ordenha do dia. O diagnóstico de metrite foi realizado através da presença de corrimento uterino fétido vermelho-acastanhado (SHELDON et al., 2010). A descarga vaginal foi obtida através palpação transretal sendo retraído a cérvix e o útero para obtenção de fluido de origem uterina. As coletas de sangue foram realizadas na semana anterior ao parto e duas coletas até os 21 dias posteriores ao parto. Para efeito de comparação dos metabólitos sanguíneos um grupo controle foi formado por 80 animais saudáveis.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA

Os animais com mastite clínica foram obtidos através da identificação de leite alterado ou sinais de inflamação de um ou mais quartos mamários durante os primeiros 60 dias de lactação. O teste da caneca de fundo preto (TCFP) foi realizado através do descarte dos primeiros jatos, conforme a rotina de ordenha estabelecida pela propriedade. As coletas de sangue foram realizadas na semana anterior ao parto e duas coletas até os 21 dias posteriores ao parto. Para efeito de comparação dos metabólitos sanguíneos, um grupo controle foi formado por 80 animais saudáveis.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OCORRÊNCIA DE MASTITE SUBCLÍNICA

Os animais foram selecionados através do teste do CMT. A mastite subclínica foi identificada nos animais através da reação no teste CMT ($>$ zero) e submetidos a coletas de leite de maneira asséptica e individualizados os quartos mamários. A melhor sensibilidade e especificidade do CMT é obtida quando utilizado três dias após o parto e utilizado o limiar de reação maior que zero e da CCS $> 100 \times 10^3$ cel/mL (SARGEANT et al., 2001). Amostras refrigeradas foram enviadas para laboratório para contagem de células somáticas, através do método de citometria de fluxo (SomatoScop CA3A5, Dairy Equipments, USA), contagem total de bactérias (Bactocount IBC, Dairy Equipments,

USA). Como *gold-standard* para mastite subclínica foi utilizada a contagem de células somáticas (CCS) superior a 100×10^3 cel/mL.

As amostras positivas no teste do CMT foram congeladas para posterior envio ao laboratório para isolamento e identificação bacteriano em laboratório de referência.

No laboratório da fazenda, as amostras positivas no teste do CMT foram submetidas a cultura microbiológica, através de sementeira de leite *in natura* (10 μ L) em placas bipartidas em meios de ágar sangue e MacConkey e incubadas em ambiente aeróbico por até 72 horas a 37,5 °C. As vacas que tiveram amostras do quarto mamário com crescimento microbiológico com contagem superior a 20 UFC em 24-48 horas, foram submetidas a tratamento com 5 g de antibiótico intramamário a base de 75 mg de ampicilina sódica e cloxacilina sódica 200 mg (Bovigam L, Bayer, Brasil), durante sete aplicações com intervalo de 24 horas associado a aplicação parenteral de amoxicilina trihidratada (Bactrosina, Bayer, Brasil), na dose de 7,5 mg/kg de peso vivo em três aplicações com intervalo de 24 horas. As coletas de sangue foram realizadas na semana anterior ao parto e duas coletas até os 21 dias posteriores ao parto. Após 21 dias do término do tratamento, as análises de leite foram repetidas para identificação da eficiência do tratamento. Para efeito de comparação dos metabólitos sanguíneos, um grupo controle foi formado por 80 animais saudáveis.

COLETA DE SANGUE E ANÁLISES

As amostras de sangue foram coletadas na veia coccígea em tubos com anticoagulante (EDTA) e tubos sem anticoagulante uma vez antes do parto (-5 ± 4 dias) e duas após o parto com intervalo semanal (5 ± 4 dias e 15 ± 7 dias). O envio das coletas para o laboratório foi feito num prazo de 2 horas. No laboratório as amostras foram centrifugadas (2.500 rpm, 10 minutos) para obtenção de soro e plasma sanguíneo, os quais eram divididas em frações e conservadas a -20 °C, em tubos *ependorf*. Foi realizado leucograma diferencial através de aparelho automático (Cell Dyn Ruby, Abbott/ poch-100iv, Sysmex, USA) e microscopia óptica. As amostras de soro foram analisadas para Ca total e glicose, utilizando Architect C8000 (Abbott). As concentrações séricas de BHB foram aferidas através do medidor digital (Ketovet, Coreia) (IWERSSEN et al., 2009).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências e percentuais e associadas entre os grupos pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média, o erro padrão da média e o intervalo de 95% de confiança. As variáveis com distribuição assimétrica foram descritas pela mediana, o mínimo e o máximo. Para avaliar a mudança entre os grupos e ao longo das coletas foi utilizado o modelo de Equações de Estimções Generalizadas. Para comparar as variáveis assimétricas entre os grupos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Os testes de identificação da mastite subclínica foram analisadas através da análise de Pearson. Foi realizada uma ordenação por postos das variáveis assimétricas e posteriormente realizadas as comparações múltiplas pelo teste post hoc de Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No total participaram do estudo 133 vacas, das quais, 102 eram multíparas e 31 primíparas para diferentes análises durante o parto de vacas leiteiras. Em razão de parto prematuro e morte no parto, 128 animais foram avaliados após o parto na ocorrência de diversas patologias (Tabela 2). Para a realização das análises foram desconsiderados do estudo animais com duas ou mais patologias concomitantes. Ao total foram analisados os dados de 115 vacas, dos quais o grupo controle foi formado por 80 (69,5%) animais saudáveis.

A metrite foi diagnosticada em 10 (7,8%) animais no estudo, através da distensão dos cornos uterinos e presença de descarga de fluido uterino fétido e de coloração vermelho-castanho. Três animais apresentaram outras patologias associadas e não foram contabilizados no estudo. Não houve animais com indicativo de metrite puerperal nos animais do estudo. Dois animais (1,5%) foram diagnosticados com retenção das membranas fetais no período do estudo.

A mastite subclínica foi identificada em doze (9,3%) animais. Quatro animais apresentaram outras patologias associadas e não foram considerados no estudo. O tratamento foi estabelecido em dezenove quartos mamários (3,71%), identificados através do teste positivo do CMT e crescimento de bactérias acima de 20 UFC realizado por cultivo microbiológico na fazenda.

A mastite clínica foi identificada em vinte e três animais (17,9%) no período do estudo. Três animais apresentaram outras patologias associadas e não foram considerados no estudo. O tratamento foi estabelecido em 33 quartos mamários (6,44%) para mastite clínica no período do estudo, identificados através do teste da caneca de fundo preto com leite alterado no desprezo dos primeiros jatos pelos operadores da ordenha. Três (2,3%) animais tiveram descarte prematuro em razão da ocorrência de mastite.

A incidência de transtornos metabólicos subclínicos nos animais analisados no estudo foi de 65,2% para hipocalcemia, 74,1% para cetose subclínica e de 71,8% para hipoglicemia.

Não houve diferença estatística significativa para ocorrência dos transtornos metabólicos, os quatro grupos tem frequência similar desses transtornos do ponto de vista estatístico conforme a Tabela 3.

O BHB houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P < 0,001$) (Figura 5). No grupo mastite, houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,048$) e entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,010$). No grupo controle houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P < 0,001$) e entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,003$) (Tabela 4).

O ECC houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P < 0,001$) (Figura 5). No grupo metrite, houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P < 0,001$) e entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,020$). No grupo mastite houve diferença entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,012$). No grupo mastite subclínica também entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,025$). No grupo controle houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,011$) e entre as coletas 1 e 3 ($P < 0,001$) (Tabela 5).

Os níveis de cálcio não apresentaram uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P = 0,411$). Não houve diferença entre as coletas e entre os grupos (Tabela 6).

Os níveis de glicose houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P < 0,001$) (Figura 5). No grupo metrite, houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,038$). No grupo controle também houve diferença entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,019$), e entre as coletas 2 e 3 ($P = 0,009$) (Tabela 7).

A temperatura retal houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P < 0,001$) (Figura 5). No grupo metrite, houve diferença entre as coletas 1 e 3 ($P < 0,001$). No grupo mastite subclínica entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,004$) e entre as coletas 2 e 3 ($P = 0,027$). No grupo controle houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,011$) e entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,001$) (Tabela 8).

A contagem dos leucócitos houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P = 0,024$) (Figura 5). Na coleta 1 houve diferença entre os grupos controle e mastite subclínica ($P = 0,004$). No grupo controle houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,047$) e entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,027$) (Tabela 9).

A contagem dos neutrófilos houve uma diferença estatística significativa na forma de variar os grupos ($P < 0,001$) (Figura 5). No grupo metrite, houve diferença entre as coletas 1 e 3 ($P = 0,038$). No grupo mastite houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,020$). No grupo controle houve diferença entre as coletas 1 e 2 ($P = 0,001$) e entre as coletas 1 e 3 ($P < 0,001$) (Tabela 10).

PRODUÇÃO MÉDIA E DESCARTE PREMATURO DO REBANHO

A produção nos primeiros 60 dias em lactação dos animais analisados do estudo apresentou uma média de 25,87 litros (\pm 6,9 litros). Houve diferença estatística significativa na distribuição de número de lactações entre os grupos com metrite e com mastite, tendo o grupo com mastite um maior número mediano de lactações ($P=0,031$) (Figura 6). A apresentação de metrite apresentou uma tendência de maior ocorrência nas primíparas, enquanto que a mastite subclínica e clínica de ocorrer em múltíparas ($P=0,069$) (Tabela 11). Não houve diferença significativa na produção média diária entre os grupos (Figura 7). Após o parto sete animais foram descartados ou morreram por diferentes causas nos primeiros 60 dias em lactação.

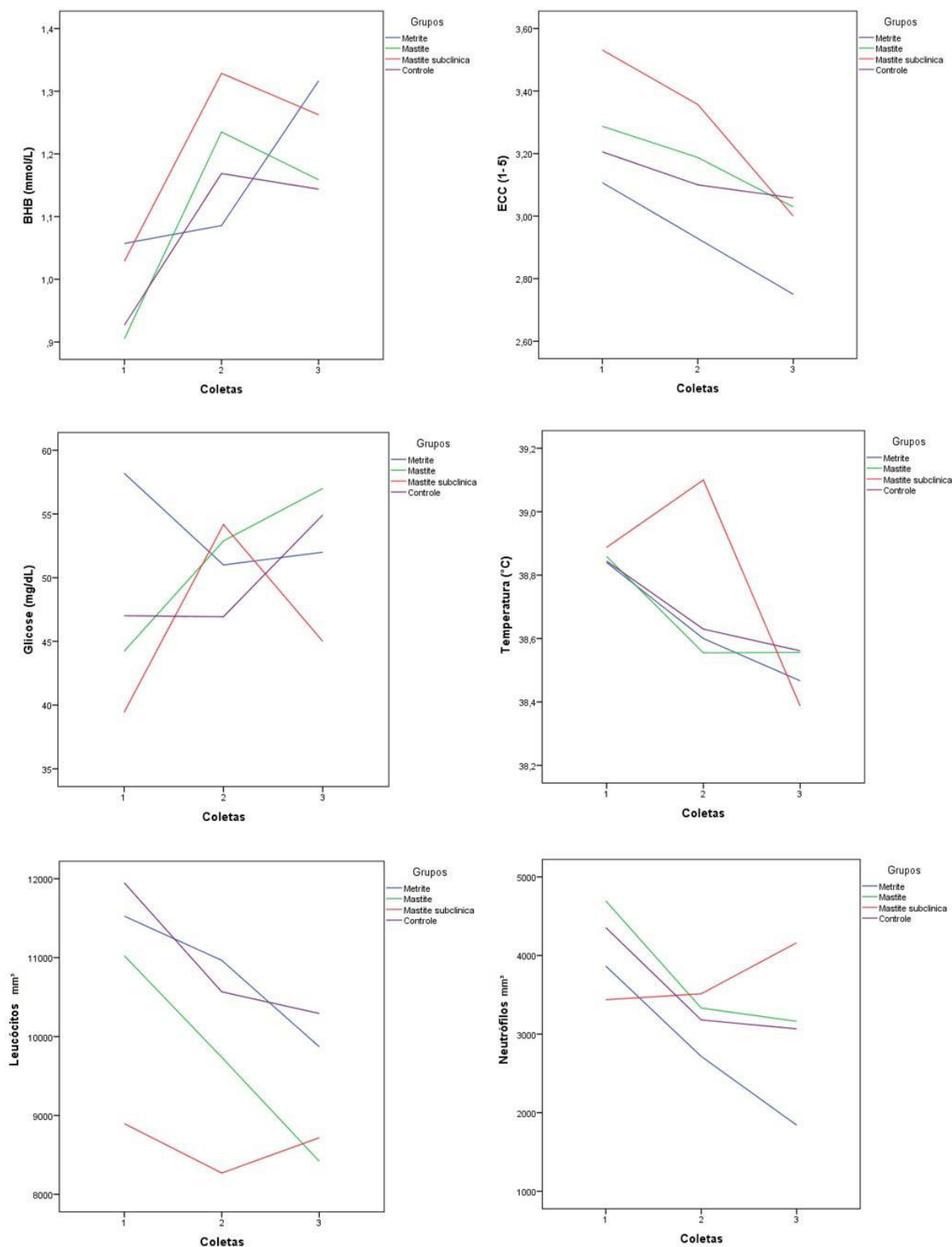


Figura 5. Evolução dos valores de β -hidroxi-burirato (BHB), níveis de glicose, temperatura retal, escore de condição corporal (ECC) e contagem de leucócitos e neutrófilos entre os grupos. A coleta 1 foi realizada na semana anterior ao parto (-5 ± 4 dias); coleta 2, na primeira semana após o parto (5 ± 4 dias); coleta 3, na segunda semana após o parto (15 ± 7 dias).

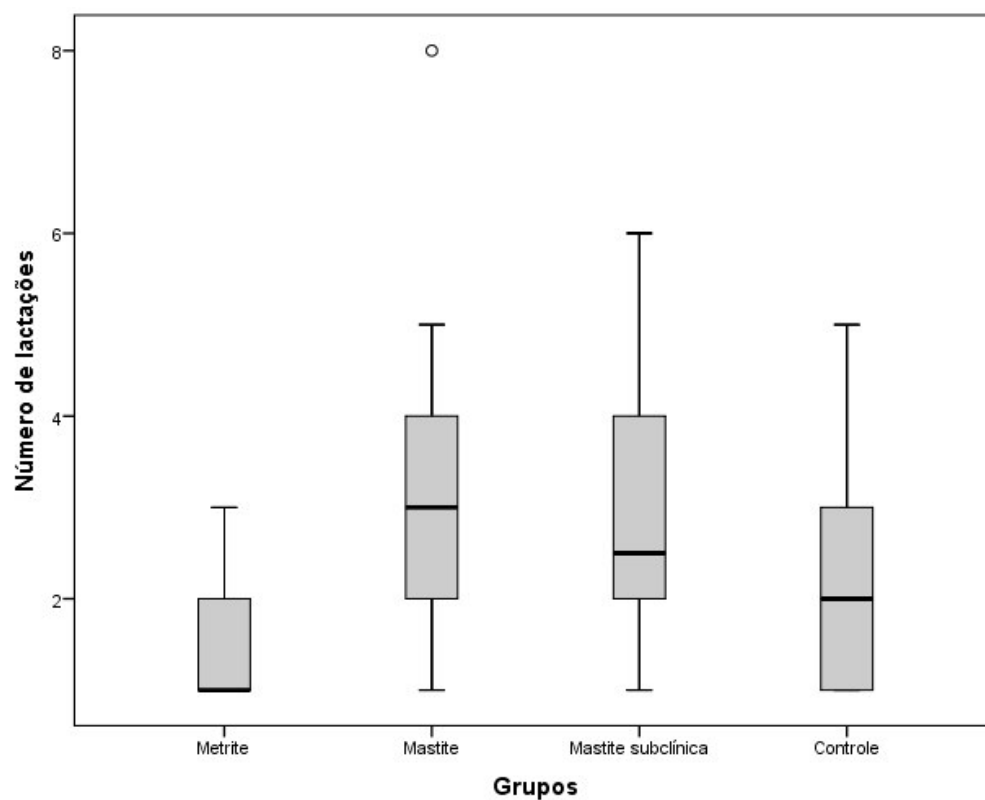


Figura 6. Distribuição das médias e desvio padrão do número de lactação entre os grupos do estudo

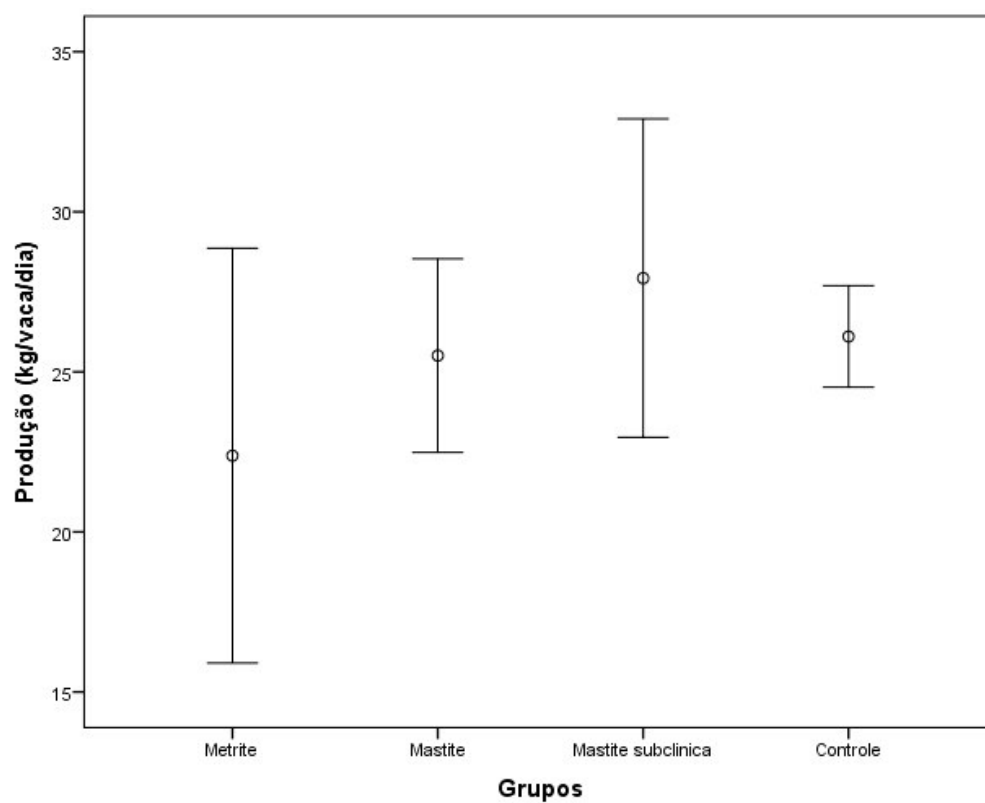


Figura 7. Distribuição das médias e desvio padrão da produção de leite nos primeiros 60 dias em lactação entre os grupos do estudo

Tabela 2. Ocorrência de patologias e descartes prematuros do rebanho no período do estudo

Patologias / descarte prematuro	N	%
Mastite clínica	23	36,9
Mastite subclínica	12	18,8
Metrite	10	15,6
Patologias podais	3	4,6
Descarte por mastite	3	4,6
Mortes	3	4,6
Retenção das membranas fetais	2	3,1
Descartada	1	1,5
Descarte baixa produção	1	1,5
Deslocamento de abomaso	1	1,5
Distocia	1	1,5
Hipocalcemia clínica	1	1,5
Lesão sistema locomotor	1	1,5
Timpanismo de ceco	1	1,5
Tristeza parasitária	1	1,5
Total	64	

Tabela 3. Incidência (%) dos transtornos metabólicos subclínicos entre os grupos de afecções uterina e mamária

	Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	P*
Hipocalcemia	4 (57,1)	15 (75,0)	4 (50,0)	52 (65,0)	0,601
Hipoglicemia	2 (40,0)	15 (83,3)	5 (100,0)	62 (69,3)	0,118
Cetose subclínica	5 (71,4)	17 (85,0)	6 (75,0)	55 (70,5)	0,629

* Comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Tabela 4. Medidas descritivas do BHB entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	1,06	0,91	1,03	0,93	
	Erro padrão	0,04	0,06	0,11	0,04	
	IC95%	Limite inferior	0,97	0,79	0,82	0,85
		Limite superior	1,14	1,02	1,24	1,00
2	Média	1,09	1,24	1,33	1,17	
	Erro padrão	0,13	0,10	0,19	0,05	
	IC95%	Limite inferior	0,83	1,03	0,96	1,07
		Limite superior	1,34	1,44	1,70	1,27
3	Média	1,32	1,16	1,26	1,14	
	Erro padrão	0,30	0,11	0,13	0,05	
	IC95%	Limite inferior	0,74	0,95	1,01	1,04
		Limite superior	1,90	1,37	1,51	1,25

Tabela 5. Medidas descritivas da ECC entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	3,11	3,29	3,53	3,21	
	Erro padrão	0,12	0,10	0,19	0,05	
	IC95%	Limite inferior	2,87	3,10	3,16	3,11
		Limite superior	3,35	3,47	3,90	3,30
2	Média	2,93	3,19	3,36	3,10	
	Erro padrão	0,14	0,09	0,13	0,05	
	IC95%	Limite inferior	2,65	3,00	3,10	3,01
		Limite superior	3,20	3,37	3,62	3,19
3	Média	2,75	3,03	3,00	3,06	
	Erro padrão	0,13	0,11	0,13	0,05	
	IC95%	Limite inferior	2,49	2,81	2,74	2,96
		Limite superior	3,01	3,24	3,26	3,15

Tabela 6. Medidas descritivas do cálcio entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	6,40	7,58	7,99	8,29	
	Erro padrão	1,32	0,44	0,62	0,20	
	IC95%	Limite inferior	3,81	6,72	6,77	7,90
		Limite superior	8,99	8,44	9,20	8,67
2	Média	7,40	8,24	8,00	8,01	
	Erro padrão	0,55	0,37	0,95	0,18	
	IC95%	Limite inferior	6,33	7,52	6,14	7,66
		Limite superior	8,47	8,96	9,86	8,36
3	Média	6,36	7,55	8,80	8,16	
	Erro padrão	1,02	0,44	0,32	0,17	
	IC95%	Limite inferior	4,35	6,70	8,17	7,82
		Limite superior	8,37	8,41	9,43	8,49

Tabela 7. Medidas descritivas da glicose entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	58,20	44,22	39,43	47,01	
	Erro padrão	3,64	4,60	7,71	2,30	
	IC95%	Limite inferior	51,07	35,22	24,33	42,51
		Limite superior	65,33	53,23	54,53	51,51
2	Média	51,00	52,89	54,17	46,93	
	Erro padrão	5,38	4,67	3,01	2,34	
	IC95%	Limite inferior	40,45	43,73	48,26	42,34
		Limite superior	61,55	62,05	60,07	51,53
3	Média	52,00	57,00	45,00	54,93	
	Erro padrão	6,42	4,04	6,17	2,43	
	IC95%	Limite inferior	39,42	49,08	32,90	50,17
		Limite superior	64,58	64,92	57,10	59,69

Tabela 8. Medidas descritivas da temperatura entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	38,84	38,86	38,89	38,84	
	Erro padrão	0,08	0,10	0,08	0,05	
	IC95%	Limite inferior	38,68	38,67	38,74	38,75
		Limite superior	39,00	39,05	39,04	38,94
2	Média	38,60	38,56	39,10	38,63	
	Erro padrão	0,16	0,15	0,25	0,06	
	IC95%	Limite inferior	38,28	38,26	38,60	38,51
		Limite superior	38,92	38,85	39,60	38,75
3	Média	38,47	38,56	38,39	38,56	
	Erro padrão	0,07	0,13	0,13	0,06	
	IC95%	Limite inferior	38,32	38,30	38,13	38,45
		Limite superior	38,61	38,81	38,65	38,68

Tabela 9. Medidas descritivas dos leucócitos entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	11526,67	11024,74	8896,25	11949,21	
	Erro padrão	2020,12	1079,29	573,29	694,18	
	IC95%	Limite inferior	7567,31	8909,36	7772,62	10588,65
		Limite superior	15486,03	13140,11	10019,88	13309,78
2	Média	10966,00	9736,67	8270,00	10566,71	
	Erro padrão	1909,47	1059,47	1178,34	637,69	
	IC95%	Limite inferior	7223,51	7660,14	5960,49	9316,86
		Limite superior	14708,49	11813,19	10579,51	11816,57
3	Média	9870,00	8419,17	8717,50	10292,94	
	Erro padrão	1871,08	857,93	1201,96	770,22	
	IC95%	Limite inferior	6202,76	6737,66	6361,70	8783,33
		Limite superior	13537,24	10100,68	11073,30	11802,55

Tabela 10. Medidas descritivas dos neutrófilos entre os grupos ao longo das coletas

Coletas		Grupos				
		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	
1	Média	3865,33	4693,42	3437,38	4355,11	
	Erro padrão	813,57	553,90	417,72	267,10	
	IC95%	Limite inferior	2270,77	3607,80	2618,67	3831,59
		Limite superior	5459,89	5779,04	4256,08	4878,62
2	Média	2715,80	3331,44	3512,67	3179,68	
	Erro padrão	713,31	386,26	1314,53	241,04	
	IC95%	Limite inferior	1317,74	2574,39	936,23	2707,25
		Limite superior	4113,86	4088,50	6089,10	3652,12
3	Média	1842,00	3162,42	4162,75	3066,73	
	Erro padrão	689,39	566,65	1469,36	250,67	
	IC95%	Limite inferior	490,83	2051,81	1282,87	2575,42
		Limite superior	3193,17	4273,02	7042,63	3558,03

Tabela 11. Comparação da distribuição da ordem de parto através da média e variação do número de lactações e produção diária média entre os grupos de estudo

		Metrite	Mastite	Mastite subclínica	Controle	P
Número de lactações	Primíparas	4 (57,1)	2 (10,0)	1 (12,5)	21 (26,2)	0,069
	Múltíparas	3 (42,9)	18 (90,0)	7 (87,5)	59 (73,8)	
Média de lactações		1 (1-3) ^a	3 (1-8) ^b	3 (1-6) ^{a,b}	2 (1-5) ^{a,b}	0,031
Produção diária média		22,4±7,0	25,5±6,5	27,9±5,9	26,1±7,1	0,457

Variáveis categóricas apresentadas pelo n(%) e comparadas pelo teste de Qui-quadrado. Dados quantitativos com distribuição simétrica descritos pela média±desvio padrão e comparados pelo teste ANOVA. Dados quantitativos descritos pela mediana (mínimo-máximo) e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. ^{a,b}letras diferentes representam medidas diferentes estatisticamente no teste post hoc de Tukey.

IDENTIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA

O tratamento para a mastite clínica foi realizado em 23 animais (17,9%) no período do estudo, dos quais, 33 quartos mamários (6,44%) receberam tratamento para mastite no período do estudo, identificados através do teste da caneca de fundo preto com leite alterado no desprezo dos primeiros jatos pelos operadores da ordenha. Três (2,3%) animais tiveram descarte prematuro em razão da ocorrência de mastite.

Os resultados do teste de CMT identificaram em 73 (57%) animais positivos. O tratamento para mastite subclínica foi realizado em 12 animais (9,37%) e 19 quartos mamários (3,71%), identificados através do teste positivo do CMT e crescimento de bactérias acima de 20 UFC realizado na fazenda.

A eficiência do tratamento para mastite subclínica através da cura microbiológica após 21 dias do tratamento foi de 83,33% por animal e 89,47% na avaliação por quarto mamário.

Os agentes com maior prevalência na mastite subclínica dos animais que receberam tratamento foram *Staphylococcus sp.* coagulase negativa (36%), *Streptococcus sp.* (sugestivo: *S. dysgalactiae*) (36%), *Staphylococcus sp.* coagulase positiva (18%) e *Staphylococcus sp.* (10%).

CULTURA MICROBIOLÓGICA

A cultura microbiológica realizado no laboratório padrão apresentou crescimento bacteriano significativo em 63 (33,5%) amostras (Tabela 12). Não houve crescimento em 115 (61,1%) amostras e 10 (5,3%) amostras apresentaram contaminação. A identificação bacteriana e frequência dos resultados positivos estão ilustrados na Figura 8.

A cultura microbiológica realizada na fazenda apresentou crescimento significativo em 88 (47,5%) amostras nas 48 horas de cultivo (Tabela 12). Não houve crescimento em 72 (38,9%) amostras analisadas e em 25 (13,5%) amostras apresentaram contaminação.

A sensibilidade e a especificidade das culturas microbiológicas do laboratório referência e as realizadas na fazenda foi de 87% e 58,9% respectivamente (Figura 9).

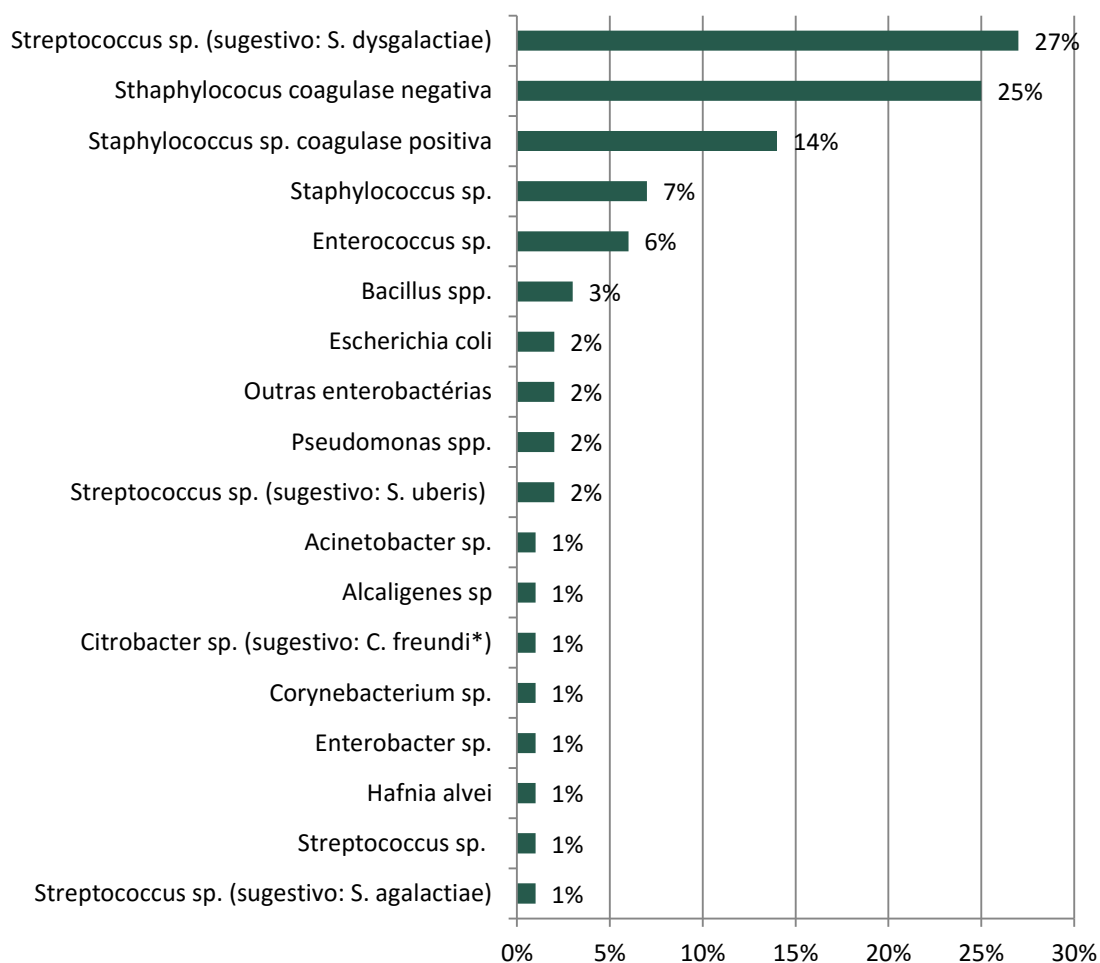


Figura 8. Distribuição das frequências nas amostras positivas no cultivo e identificação bacteriana na mastite subclínica

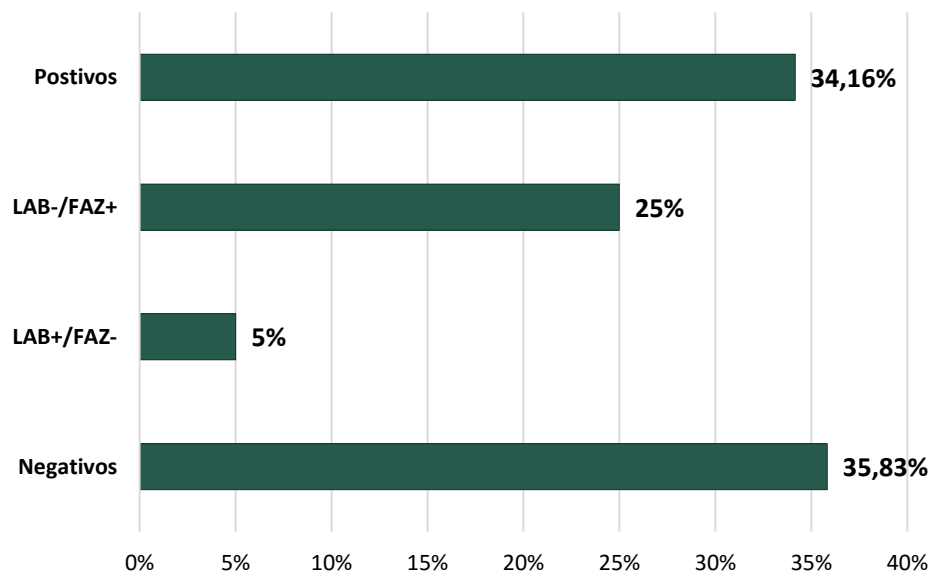


Figura 9. Frequência dos resultados microbiológicos entre os testes do laboratório oficial (LAB) e análises realizadas em cultivo na fazenda (FAZ)

Tabela 12. Amostras positivas no teste microbiológico entre os laboratórios

LAB		FAZ	
Teto	N (%)	Teto	N (%)
AE	20 (50)	AE	28 (62)
AD	5 (14)	AD	12 (40)
PE	18 (32)	PE	27 (60)
PD	20 (42)	PD	21 (53)

Laboratório oficial (LAB) e análises realizadas em cultivo na fazenda (FAZ), tetos anterior esquerdo (AE), anterior direito (AD), posterior esquerdo (PE) e posterior direito (PD).

CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DA MASTITE SUBCLÍNICA

Os resultados das médias e desvio padrão das análises CCS e CBT identificadas por quarto mamário estão demonstrados na (Tabela 13).

Os testes de CCS e CBT dos quartos mamários AE, AD, PE e PD em 169 amostras analisadas apresentaram uma correlação entre os resultados (Figura 10).

As culturas microbiológicas tiveram uma correlação entre os resultados dos quartos mamários AE, PD e PE em total de 120 amostras analisadas. A CCS e a cultura microbiológica na fazenda do teto AD apresentaram correlação entre os testes em 26 amostras analisadas ($p= 0,032$; $r= 0,42$). A CBT apresentou uma correlação entre os

resultados do crescimento bacteriano da fazenda ($p=0,045$; $r=0,32$) entre as 39 amostras analisadas do teto PD. A CBT apresentou também correlação com o crescimento bacteriano no laboratório em 34 amostras analisadas do teto PD ($p= 0,008$; $r=0,44$) (Tabela 14).

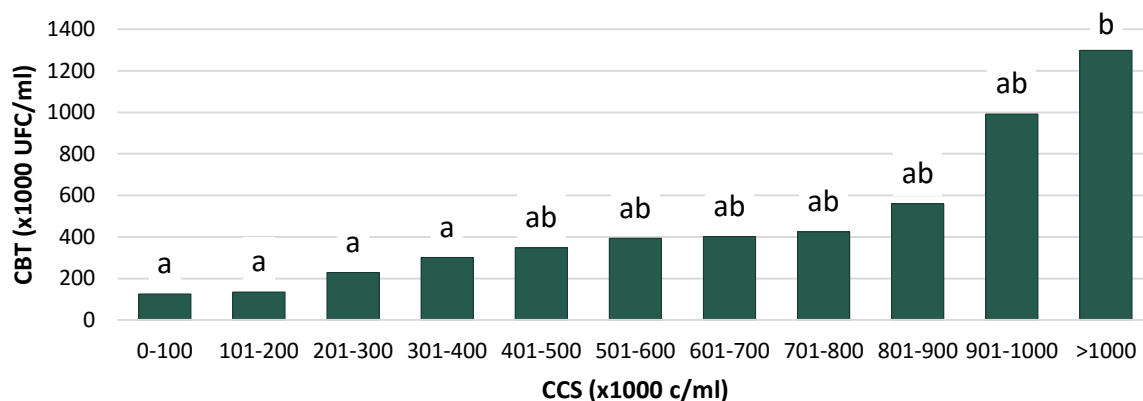


Figura 10. Relação entre a CBT média e faixas de valores da CCS. Diferença estatística está representada pela diferença entre as letras a e b através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 13. Análises de leite por quarto mamário em amostras com diagnóstico positivo de mastite subclínica no teste do CMT

Análise	Teto	Média	Desvio padrão	N
CCS (x1000 cel/ml)	AE	1285	1930	46
	AD	620	1083	39
	PE	1557	1762	53
	PD	1534	2065	47
CBT (x1000 UFC/ml)	AE	531	851	50
	AD	380	703	33
	PE	824	1202	57
	PD	777	1200	52

Teto anterior esquerdo (AE), anterior direito (AD), posterior esquerdo (PE) e posterior direito (PD).

Tabela 14. Correlação de Pearson entre os testes de mastite subclínica identificados por quartos mamários

	CBT		LAB		FAZ LAB	
CCS	AE p= 0,036 r=0,32 n=43	AD p= 0,004 r=0,5 n=31			AE p= 0,032 r=0,42 n=26	AD
	PE p< 0,0001 r= 0,59 n=52	PD p= 0,01 r=0,38 n=43			PE	PD
CBT			AE	AD	AE	AD
			PE	PD p= 0,008 r=0,44 n=34	PE	PD p=0,045 r=0,32 n=39
LAB					AE p< 0,0001 r=0,61 n=38	AD
					PE p= 0,038 r= 0,31 n=43	PD p= 0,003 r=0,45 n=39

Laboratório oficial (LAB) e análises realizadas em cultivo na fazenda (FAZ), tetos anterior esquerdo (AE), anterior direito (AD), posterior esquerdo (PE) e posterior direito (PD).

DISCUSSÃO

A incidência da hipocalcemia subclínica é uma condição comum observada durante os primeiros dias após o parto e marcante de acordo com o número de lactações (REINHARDT et al., 2011). Esse aumento no risco de sofrer hipocalcemia é devido às despesas de cálcio pela glândula mamária, à diminuição da capacidade para mobilizar cálcio dos ossos e, possivelmente, a uma redução do número de receptores de 1,25-dihidroxi-colecalciferol no intestino (GOFF et al., 1989). Diferentes faixas de valores de cálcio no soro de bovinos foram associados a patologias do período puerperal: 8,59 mg/dL (MARTINEZ et al., 2012) ou < 8,8 mg/dL (CHAPINAL et al., 2011). O presente estudo utilizou o valor de 8,00 mg/dL como ponto de corte para estabelecer a ocorrência da hipocalcemia subclínica (GOFF, 2008). A incidência de hipocalcemia subclínica foi de 65,2% dos animais, cetose subclínica foi de 74,1% e hipoglicemia de 71,8%. A elevada incidência de patologias e transtornos metabólicos no período puerperal foram observadas em estudos desenvolvidos na Europa (SUTHAR et al., 2013), assim como, trabalhos realizados no Chile (SEPÚLVEDA-VARAS et al., 2015), em sistemas pastoris semelhantes aos conduzidos no estudo. Os resultados obtidos no estudo não evidenciaram associação significativa da hipocalcemia, hipoglicemia e cetose no período puerperal, analisados entre semana que antecede o parto (-5 ± 4 dias) e após o parto com intervalo semanal (5 ± 4 dias e 15 ± 7 dias) com as patologias uterinas e da glândula mamária.

A incidência de metrite foi observada em 7,8% dos animais do estudo. O grupo de animais com metrite apresentou redução nos valores de ECC, níveis de glicose e temperatura retal após o parto. Assim como, foi observada uma tendência ($P= 0,069$) de aumento de ocorrência de metrite em vacas primíparas. O baixo ECC do grupo com ocorrência de metrite apresentou maior dependência dos níveis de glicose após o parto. A drástica diminuição das concentrações de glicose no sangue durante a mobilização de lipídeos em casos de cetose intensa pode afetar as defesas do hospedeiro no período próximo ao parto, limitando os combustíveis necessários às populações de células imunes. Evidenciando que a saúde uterina está associado com comprometimento da função dos neutrófilos e balanço energético negativo que começa antes do parto e se estende até o início da lactação (HAMMON et al., 2006). Assim como, o conceito de que uma reação inflamatória ativada pode competir com outros processos relacionados com a produção (síntese de leite) e obtenção de nutrientes limitados podem ser responsáveis

pela diminuição da eficiência produtiva de vacas leiteiras durante a morbidade (SORDILLO; RAPHAEL, 2013). Os resultados sugerem que possa ter havido um restrição ao acesso dos nutrientes, conseqüentemente uma redução de consumo de matéria seca após o parto, visto que animais com ocorrência de metrite, apresentaram grande dispersão dos valores de BHB, cálcio e da produção dos animais. Estudos com animais que apresentaram cetose subclínica após o parto, foi demonstrado redução de consumo e menor número de visitas ao cocho na semana anterior ao parto (GOLDHAWK et al., 2009). Os baixos níveis de cálcio são correlacionados a redução do consumo de matéria seca no início da lactação (GOFF, 2006), o que pode ser relacionado ao menor ECC e redução da produção de leite.

A incidência de mastite clínica foi observada em 17,9% dos animais do estudo. As vacas com mastite clínica apresentaram elevação dos valores de BHB após o parto, redução de ECC e da contagem de neutrófilos. Em conformidade a estudos descritos anteriormente por Curtis et al. (1985), a ocorrência de mastite no estudo foi atribuída a vaca mais velhas. O número médio foi de três lactações (variando de 1-8), quando comparados com os grupos de animais com metrite com número médio de uma lactação (variando de 1-3). Estudos indicam que o aumento dos valores de BHB são atribuídos ao início da lactogênese (CONTRERAS; SORDILLO, 2011), no entanto a redução da contagem de neutrófilos foi atribuído aos mecanismos fisiológicos do parto, em estudos desenvolvidos comparado vacas lactantes com vacas mastectomizadas (KIMURA; GOFF; KEHRLI, 1999). A ênfase na seleção genética para maximizar a produção de leite aumentou tensões metabólicas associadas com a síntese do leite e secreção, evidenciado pela correlação negativa entre a capacidade de produção de leite e resistência à mastite (SORDILLO; STREICHER, 2002).

A incidência de mastite subclínica foi observada em 9,3% dos animais do estudo. Os animais com mastite subclínica apresentaram no período anterior ao parto valores de contagem de leucócitos inferiores ao grupo controle. Após o parto foi observado redução no ECC e elevação da temperatura retal. Os resultados estão em acordo com estudos prévios em animais acometidos com infecções mamárias subclínica apresentaram maiores ECC no pré-parto e maior perda de condição corporal em relação com as vacas que não desenvolveram mastite subclínica (REZAMAND et al., 2007). A disfunção ou respostas inflamatórias não reguladas são mencionadas como elo comum entre o aumento

da incidência de transtornos metabólicos e doenças infecciosas durante o período de transição (SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

Os agentes Gram-positivos identificados com maior frequência em casos de mastite incluem o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Enterococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e o *Streptococcus dysgalactiae* (PAAPE *et al.*, 2002) e estiveram em acordo com os resultados de identificação bacteriana encontrados nos animais com mastite subclínica avaliados nos animais do estudo.

A CCS e a CBT dos quartos mamários analisados apresentaram resultados em acordo com outros estudos associados em prever eventos de saúde do quarto mamário quando a CCS foi superior a 400×10^3 cel/mL (ANDERSON *et al.*, 2010). O tratamento antimicrobiano baseado unicamente no teste de CMT não pode ser justificado, visto que os resultados dos cultivos bacterianos revelaram uma frequência elevada de resultados sem crescimento bacteriano nos métodos de cultivos padrão.

A sensibilidade (87%) e especificidade (58,9%) do teste microbiológico realizado na fazenda em relação ao teste padrão realizado no laboratório foi capaz de identificar animais com crescimento bacteriano, ainda que a frequência de crescimento do teste realizado na fazenda tenha sido superior (25%) ao teste padrão. O aumento ocorrência dos resultados positivos no cultivo na fazenda pode ser atribuído em razão das amostras não terem sido congeladas. Apesar do teste de cultivo requiera pessoas habilitadas para a realização e interpretação, o teste pode ser encorajado em fazendas leiteiras com o propósito identificar mastites subclínicas no rebanho e reduzir o uso de antibióticos em situações que o crescimento bacteriano não é identificado como causa da mastite.

CONCLUSÃO

Animais acometidos pela metrite apresentaram baixo ECC anterior ao parto e revelaram elevada dependência dos níveis de glicose após o parto associados a manifestação da patologia, assim como uma tendência de maior ocorrência em primíparas. As vacas que desenvolveram mastite nos primeiros 60 dias em lactação apresentaram elevados níveis de BHB após o parto e a manifestação da doença foi observada em vacas mais velhas, quando comparado com os animais do grupo com metrite. Após o parto a elevação da temperatura retal associada a infecção da glândula mamária em vacas identificadas com mastite subclínica em animais com elevado ECC. Através dos níveis do cálcio no soro não foi possível identificar associação com a manifestação de afecções uterinas e da glândula mamária no estudo. A CCS e a CBT foram indicadores importantes em prever a saúde da glândula mamária dos animais avaliados nas duas primeiras semanas após o parto. O trabalho não encontrou associação entre os transtornos metabólicos metabólicos do cálcio, glicose e corpos cetônicos associados a ocorrência de patologias uterinas e/ou mamas após o parto. A contagem de leucócitos no período periparto de vacas com mastite foram influenciadas pelo status energético e sugere que mais trabalhos devem ser conduzidos para avaliar a resistência as infecções ligadas a função e atividade das células de defesa no periparto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K. L.; CORREA, M. T.; ALLEN, A.; RODRIGUEZ, R. R. Fresh cow mastitis monitoring on day 3 postpartum and its relationship to subsequent milk production. **Journal of dairy science**, 2010. v. 93, n. 12, p. 5673–5683.
- BELL, A. W. Early lactation regulation of organic nutrient late pregnancy metabolism during transition from to early. **Journal of animal science**, 1995. v. 73, n. 9, p. 2804–2819.
- BONNETT, B. N.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H. Associations of clinical findings , bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. **Science**, 1993. v. 15, p. 205–220.
- BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. **Science**, 2003. v. 19, p. 1–45.
- CHAPINAL, N.; CARSON, M.; DUFFIELD, T. F.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS, J. E. P.; LEBLANC, S. J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of dairy science**, 2011. p. 4897–4903.
- CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 2011. v. 34, n. 3, p. 281–289.
- CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. **Seminário internacional sobre deficiências minerais em ruminantes**, 1998.
- CORREA, M. T.; ERB, H. N.; SCARLETT, J. Path analysis for seven postpartum disorders of holstein cows. **Journal of dairy science**, 1993. v. 76, p. 1305–1312.
- CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFEN, C. J.; SMITH, R. D.; KRONFELD, D. S. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in holstein cows. **J. dairy sci.**, 1985. v. 68, n. 9, p. 2347–2360.
- CURTIS, C. R.; SNIFFEN, C. J.; SMITH, R. D. Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. **Journal of dairy science**, Apr. 1984. v. 67, n. 4, p. 817–25. Disponível em:
- DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y. H.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L. Evaluation of the california mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Canadian veterinary journal**, 2003. v. 44, n. 5, p. 413–416.
- DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Jornal dairy science.**, 1999. v. 82, p. 2259–2273.
- EAN, I. J.; DEGARIS, P. J. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. **The veterinary journal**, 2009. v. 176, n. 1, p. 58–69.
- EDMONSON, A.; LEAN, I.; WEAVER, L.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, 1989. v. 72, n. 1, p. 68–78.
- GALVÃO, K. N.; FLAMINIO, M. J. B. F.; BRITTIN, S. B.; SPER, R.; FRAGA, M.;

- CAIXETA, L.; RICCI, A.; GUARD, C. L. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating holstein cows. **Journal of dairy science**, 2010. v. 93, n. 7, p. 2926–2937.
- GOFF, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. **National animal disease center**, 2000. p. 1–16.
- GOFF, J. P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of dairy science**, 2006. v. 89, n. 4, p. 1292–1301.
- GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **The veterinary journal**, 2008. v. 176, n. 1, p. 50–57.
- GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E.; HORST, R. L. Periparturient hypocalcemia in cows : prevention using intramuscular parathyroid hormone. **Journal of dairy science**, 1989. v. 72, n. 5, p. 1182–1187.
- GOFF, J. P.; KIMURA, K. Metabolic diseases and their effect on immune function and resistance to infectious disease. Metabolic Diseases and Their Effect on Immune Function and Resistance to Infectious Disease. In: Proceedings of the 41 st Annual Meeting of National Mastitis Council, **Anais**, 2002. p. 88–100.
- GOLDHAWK, C.; CHAPINAL, N.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. **Journal of dairy science**, 2009. v. 92, n. 10, p. 4971–4977.
- GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow impact of changes in organic nutrient metabolism feeding the transition dairy cowl. **Journal of animal science**, 1995. v. 73, p. 2820–2833.
- HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J P; WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in holstein cows with uterine health disorders. **Blood**, 2006. v. 113, p. 21–29.
- HAYIRLI, A.; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E. V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in holsteins. **Journal of dairy science**, 2002. v. 85, n. 12, p. 3430–3443.
- HORST, R. L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. **Journal of dairy science**, 1986. v. 69, n. 2, p. 604–616.
- HORST, R. L.; JORGENSEN, N. A. Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants1. **Journal of dairy science**, 1982. v. 65, n. 12, p. 2332–2337.
- HUZZEY, J. M.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. **Journal of dairy science**, 2007. v. 90, n. 7, p. 3220–3233.
- IWERSEN, M.; FALKENBERG, U.; VOIGTSBERGER, R.; FORDERUNG, D.; HEUWIESER, W. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. **Journal of dairy science**, 2009. v. 92, n. 6, p. 2618–2624.
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, 2004. v. 62, p. 9–23.
- KEHRLI, MARCUS E; GOFF, JESSE P; HARP, J. A.; THURSTON, J. R. Effects of preventing periparturient hypocalcemia in cows by parathyroid hormone administration

on hematology , conglutinin , immunoglobulin , and shedding of staphylococcus aureus in milk fed a high calcium diet to induce. **Science**, 1990. p. 2103–2111.

KEHRLI, MARCUS E; GOFF, JESSE P. Periparturient hypocalcemia in cows : effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. **Journal of dairy science**, 1989. v. 72, n. 5, p. 1188–1196.

KIMURA, KAYOKO; GOFF, JESSE P; KEHRLI, MARCUS E; REINHARDT, TIMOTHY A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of dairy science**, 2002. v. 85, n. 3, p. 544–50.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, 1999. v. 82, n. 11, p. 2385–92.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle 1. **Journal of dairy science**, 2006. v. 89, n. 7, p. 2588–2595.

LEAN, I. J.; DEGARIS, P. J. Hypocalcemia in dairy cows : meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. **Journal of dairy science**, 2006. v. 89, n. 2, p. 669–684.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of dairy science**, 2002. v. 85, n. 9, p. 2223–2236.

LEBLANC, S. J. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The journal of reproduction and development**, 2010. v. 56 Suppl, p. S29–S35.

MARTINEZ, N.; RISCO, C. A.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K. Evaluation of periparturient calcium status , energetic profile , and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of dairy science**, 2012. v. 95, n. 12, p. 7158–7172.

MARTINEZ, N.; SINEDINO, L. D. P.; BISINOTTO, R. S. *et al.* Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. **Journal of dairy science**, 2014. p. 1–14.

MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of dairy science**, 2012. v. 95, n. 9, p. 5056–66.

MULLIGAN, F.; GRADY, L. O.; RICE, D.; DOHERTY, M. Production diseases of the transition cow : milk fever and subclinical hypocalcaemia. 2006. n. 12, p. 697–702.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary clinics of north america - food animal practice**, 2004. v. 20, n. 3 SPEC. ISS., p. 651–674.

OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of dairy science**, 2004. v. 87, n. June 2003, p. E105–E119.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Scanning**, 2002. v. 7, n. 2.

- PAYNE, J. M.; DEW, S. M.; MANSTON, R.; FAULKS, M. The use of a metabolic profile test in dairy herds. **Veterinary Record**, v. 87, p. 150-157; 158, 1970.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. Metabolic disease. **Veterinary medicine. a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses**. Tenth ed., Saunders Elsevier, Edinburgh, 2007, p. 2156.
- REINHARDT, T A; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; GOFF, J P; HORST, R L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **Veterinary journal**, 2011. v. 188, n. 1, p. 122–124.
- REZAMAND, P.; HOAGLAND, T. A.; MOYES, K. M.; SILBART, L. K.; ANDREW, S. M. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient holstein and jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. **Journal of dairy science**, 2007. v. 90, n. 11, p. 5097–5107.
- RISCO, CARLOS A.; RETAMAL, P. M. **Dairy Production Medicine.**, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2011.
- SANTOS, J. E. P.; SANTOS, F. A. P. Novas estratégias no manejo e alimentação de vacas pré-parto de vacas pré-parto. **Animal production**, 1998. p. 1–32.
- SARGEANT, J. M.; LESLIE, K E; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and california mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation 1. **Journal of dairy science**, 2001. v. 84, n. 9, p. 2018–2024.
- SAUN, R. VAN. Metabolic profiling : assessing nutritional status of the transition cow. **Department of veterinary and biomedical sciences, pennsylvania state university**, 2005. p. 1–8.
- SCHUKKEN, Y.; WILSON, D.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary research**, 2002. v. 33, n. 3, p. 239–250.
- SEPÚLVEDA-VARAS, P.; WEARY, D. M.; NORO, M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. **Plos one**, 2015. v. 10, n. 3, p. 1–13.
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, 2010. v. 65, n. 2006, p. 1516–1530.
- SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal reproduction science**, 2004. v. 82-83, p. 295–306.
- SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary clinics of north america - food animal practice**, 2013. v. 29, n. 2, p. 267–278.
- SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. 2002. v. 7, n. 2.
- SUTHAR, V. S.; CANELAS-RAPOSO, J.; DENIZ, A.; HEUWIESER, W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in european dairy cows. **Journal of dairy science**, 2013. v. 96, n. 5, p. 2925–38.
- VANDEHAAR, M. J.; YOUSIF, G.; SHARMA, B. K.; HERDT, T. H.; EMERY, R. S.; ALLEN, M. S.; LIESMAN, J. S. Effect of energy and protein density of prepartum diets

on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period 1. **Journal of dairy science**, 1999. v. 82, n. 6, p. 1282–1295.

VERBEKE, J.; POUCKE, M. V.; PEELMAN, L.; PIEPERS, S.; VliegHER, S. D. Associations between *cxcr1* polymorphisms and pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis, test-day somatic cell count, and test-day milk yield. **Journal of dairy science**, 2014. v. 97, n. 12, p. 7927–7939.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, 2011. p. 357–372.

ANEXO A

Tabela 15. Dieta formulada através do programa Spartan 3 para os animais em lactação

	MS	Alimento	MS	% dieta	FDN	ELL	PC	PNR
	kg	kg	%	% MS	%MS	Mcal/kg	%MS	%PC
Nome do alimento				Ingerida				
Água	0	2	0,04	0	0	0	0	0
Ração lactação	7,7	8,5	90,54	33,41	13,7	1,92	22,7	63
Silagem de Milho	7,2	20	36	31,26	41	1,52	6,8	27
Pré-secado Azéven	6,63	11,84	56	28,79	44	1,49	18,9	18
Pasto Piatan / Papuã	0,8	5,33	15	3,47	48	1,39	10	20

	MS	Alimento	MS	% dieta	FDN	ELL	PC	PNR
	kg/dia	kg/dia	%	%MS	g/dia	Mcal/kg	kg/dia	kg/dia
				ingerida				
Fornecido	23,03	48,47	47,5	100	7,9	37,2	3,6	1,48
Requerimento	23,08				6,9	36,8	3,6	1,42
Diferença	-0,05				0,9	0,5	0	0,07

	FDN	FDNef	FDNfor	ELL	CP	PDR	PDR dig	PM
	%MS	%MS	%MS	Mcal/kg	%MS	%MS	%MS	%MS
Fornecido	34,2	30,7	29,6	1,6	15,64	9,19	5,63	11,65
Requerimento	30	24	22,5	1,6	15,59	9,31	4,91	10,91
Diferença	4,2	6,7	7,1	0	0,05	-0,12	0,72	0,74

	Amido	Amido DR	AG	CNF	DCAD	Vit A	Vit D	Vit E
	%MS	%Amido	%MS	%MS	mEq/100g	kUI/kg	kUI/kg	UI/kg
Fornecido	25,92	65,14	3,2	42,6	27,57	8,56	1,14	28,6
Requerimento						3,97	1,07	32,9
Diferença						4,59	0,07	-4,4

	Ca	P	Mg	K	Na	Cl	S	Co
	%MS	%MS	%MS	%MS	%MS	%MS	%MS	ppm
Fornecido	0,86	0,37	0,26	1,54	0,29	0,4	0,21	0,28
Requerimento	0,77	0,37	0,2	1,08	0,23	0,26	0,21	0,11
Diferença	0,09	0	0,06	0,46	0,06	0,14	0	0,16

	Cu	Fe	I	Mn	Se	Zn
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Fornecido	12,5	37	0,61	38	0,42	56
Requerimento	11,4	28	0,52	15	0,3	49
Diferença	1,1	10	0,09	23	0,12	7

Matéria seca (MS), porcentagem referente a dieta (% dieta), fibra detergente neutro (FDN), energia referente a lactação líquida (ELL), proteína crua (PC), proteína não degradada no rúmen (PNR), fibra detergente neutro efetivo (FDNef), fibra detergente neutro da forragem (FDNfor), proteína metabolizável (PM), proteína degradável no rúmen (PDR), proteína degradável no rúmen digestível (PDRdig), amido degradável no rúmen (Amido DR), ácidos graxos (AG), carboidratos não fibrosos (CNF), diferença cátion-anión da dieta (DCAD), vitamina A (Vit A), vitamina D (Vit D), vitamina E (Vit E), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl), enxofre (S), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe) iodo (I), manganês (Mn), selênio (Se), zinco (Zn).