

EFEITO DE MEDICAMENTOS INDICADOS PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA NO PERÍODO SECO SOBRE OS ÍNDICES DE FAGOCITOSE

CAMILA FREITAS BATISTA,¹ MAIARA GARCIA BLAGITZ,¹ MILTON RICARDO AZEDO,¹
CLÁUDIA REGINA STRICAGNOLO¹ E ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA¹

1. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
E-mail: camilafre@gmail.com (autora correspondente)

RESUMO

O período seco é considerado uma fase da lactação muito vulnerável à mastite, e os mecanismos de fagocitose são especialmente importantes nessa etapa. Para avaliar a influência de medicamentos indicados para o tratamento de mastite no período seco sobre a função fagocítica de leucócitos obtidos do leite de vacas, foram utilizadas amostras pareadas de leite de vacas, negativas ao exame bacteriológico. Submeteram-se essas células à prova de fagocitose *in vitro*, após serem expostas à solução contendo os seguintes medicamentos: cefalônio anidro (M1), gentamicina (M2), benzilpenicilina procaína em associação com nafcilina e dihidroestreptomicina (M3) e cloxacilina benzatina (M4). A média dos índices de fagocitose das amostras-controle e das células submetidas aos tratamentos

M1 e M3 foram, respectivamente, (58,88% ± 12,04), (64,87% ± 15,36) e (65,14% ± 17,96) e não apresentaram diferenças entre si, bem como em relação ao controle. A média dos índices de fagocitose das células submetidas ao tratamento M4 (46,90% ± 22,08) mostrou-se menor que o controle, assim como menor do que aquela obtida das células submetidas aos tratamentos M1 e M3. Por sua vez, a média dos índices de fagocitose das células submetidas ao tratamento M2 (0,68% ± 1,63) foi expressivamente inferior àquelas encontradas no controle e nos demais tratamentos. Tais resultados sugerem a utilização de certos medicamentos comercializados para o tratamento de mastite no período seco, já que alguns deles evidenciaram não ser completamente inócuos ao hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVES: Fagocitose, mastite, período seco, tratamento.

ABSTRACT

EFFECT OF DRY COW THERAPY DRUGS ON PHAGOCYTOSIS RATES

The dry period is considered to be a phase when cows are very vulnerable to mastitis and phagocytosis mechanisms are specially important at this moment. The objective of the present trial was to evaluate the influence of dry cow therapy drugs available in the market on the phagocytic function of leukocytes obtained from cow milk. In order to do that, paired milk samples negative in bacteriological examination were submitted to *in vitro* phagocytosis test, after they were exposed to solutions of the following drugs: anhydrous cephalonium (M1), Gentamicin (M2), Benzylpenicillin

procaine associated with Nafcillin and Dihydrostreptomycin (M3) and Cloxacillin benzathine (M4). Mean phagocytosis rates of control samples and of cells submitted to treatments M1 and M3 were, respectively, (58.88% ± 12.04), (64.87% ± 15.36) and (65.14% ± 17.96) there were no differences among these samples, as well as in the comparison with the control group. Mean phagocytosis rate obtained in cells submitted to treatment M4 (46.90% ± 22.08) was lower than that of the control group, and than that of cells submitted to treatments M1 and M3. On the other hand,

mean phagocytosis rate of cells submitted to treatment M2 ($0.68\% \pm 1.63$) was lower than that observed in the control group, and than that of all other treatments. These results

show that the use of drugs available for dry cow therapy may not be totally innocuous for the host.

KEY WORDS: Dry period, mastitis, phagocytosis, treatment.

INTRODUÇÃO

Durante o período seco a vaca sofre completa involução da glândula mamária, que, posteriormente, sob influência hormonal do final da gestação e do parto, reinicia a síntese de leite. Esta fase representa também uma excelente oportunidade para o tratamento de infecções intramamárias existentes e para a prevenção de novas infecções que afetam negativamente a produção leiteira da lactação subsequente (SANTOS, 2003).

Segundo HURLEY (1989), esse período é dividido em três fases: período de involução ativa, período de involução constante e período de lactogênese ou colostrogênese. O período de involução ativa se inicia logo após a última ordenha, dura cerca de trinta dias e tem por principais fatores desencadeantes a interrupção da ordenha e o aumento da pressão intramamária. Essas alterações tornam a glândula mais susceptível à instalação de infecções. Quartos infectados na secagem ou durante o período seco apresentam maiores contagens de células somáticas do que quartos não infectados.

A segunda fase, período de involução constante, não apresenta limites de duração, depende apenas da extensão do período seco e corresponde ao estágio em que a glândula está completamente involuída. Entre os três períodos, este apresenta menor incidência de infecção.

A fase de colostrogênese ou lactogênese ocorre ao final da gestação, por influência hormonal, com início de quinze a vinte dias pré-parto. Ao contrário do estágio de involução ativa, este período caracteriza-se pela regeneração e diferenciação das células epiteliais secretoras e pelo transporte seletivo e acúmulo de imunoglobulinas para a formação do colostro.

A observação de uma maior susceptibilidade a infecções no início do período seco e no começo da lactação subsequente tem levado ao

desenvolvimento de protocolos de tratamento para esse período (GREEN et al., 2002). O controle de mastite neste período objetiva diminuir o número de mamas enfermas na lactação subsequente, eliminando infecções intramamárias existentes e impedindo novas infecções durante o período em que a vaca permanecer seca (BERRY et al., 2002; SANTOS, 2003; CRISPIE et al., 2004).

Ressalta-se que a glândula mamária possui seus próprios mecanismos de defesa para combater as infecções. Dentre tais mecanismos, destaca-se a fagocitose celular (NICKERSON, 1994; NORCROSS, 1996). Essa função é realizada por células denominadas genericamente de fagócitos, que atuam na primeira linha antibacteriana de defesa.

A diversidade existente nos protocolos para tratamento de mastite pode ser explicada pela frequência com que essas mamas manifestam refratariedade à terapia, mesmo nos casos de comprovada sensibilidade do agente etiológico ao antimicrobiano empregado. Esse fato justifica a necessidade de se considerar as particularidades do hospedeiro e seus mecanismos de defesa, uma vez que a doença e a resposta ao tratamento dependem da inter-relação hospedeiro-parasita-tratamento (CRISPIE et al., 2004; BARKEMA et al., 2006).

Considera-se um bom programa para o tratamento da mastite a associação de medidas preventivas às medicamentosas. COSTA (2006) afirma que um bom antimicrobiano para esse período deve possuir ação bactericida, ter alto peso molecular, não ser irritante, ter alto grau de ligação às proteínas, ser estável em relação à atividade antimicrobiana e estar associado a veículos de eliminação e absorção lenta. O medicamento deve ser administrado com cânulas curtas (2-3 mm de comprimento), para minimizar os efeitos iatrogênicos.

São muitos os antimicrobianos indicados para o período seco existentes no mercado. A maioria pertence aos grupos dos aminoglicosí-

deos, das cefalosporinas e das penicilinas. Todos se apresentam em veículos de absorção lenta, geralmente oleosos (COSTA, 2006), sem que esses sejam discriminados no medicamento.

O uso de antimicrobianos no período seco é eficaz na eliminação do microrganismo (OWENS, et al. 2001; SHEPHARD et al., 2004; BANSAL et al., 2005), mas, em relação às células, seu efeito ainda não foi bem esclarecido. Alguns autores, em investigação da hipótese de que uma potencial interferência do medicamento atuando sobre a função imune pudesse diminuir sua eficácia terapêutica, avaliaram a ação de alguns princípios ativos nos fagócitos (NICKERSON et al., 1982; NICKERSON et al., 1986; PAAPE et al., 1990; DOSOGNE et al., 1998) e inferiram que a avaliação de função fagocítica estava sujeita a muitas interferências (PAAPE et al., 1996).

DOSOGNE et al. (1998) observaram *in vitro*, através da técnica de citometria de fluxo, que, em concentrações terapêuticas, a cefapirina e a mecilinamina não afetam a atividade antibacteriana dos fagócitos polimorfonucleares (PMN) isolados de sangue bovino, isto é, não houve efeito sobre a fagocitose. Entretanto, LINTNER & EBERHART (1990) afirmaram que, ao observar em microscopia de fluorescência a ingestão de *Staphylococcus aureus* por fagócitos PMN, esta foi reduzida quando os medicamentos testados estavam em associação com outros componentes lácteos como a gordura e a nata, fato também referido por HOEBEN et al. (1997).

NICKERSON et al. (1982, 1986) e PAAPE (1990) observaram que muitos antibióticos apresentaram efeitos inibitórios na fagocitose, mas outros ou os mesmos antibióticos em doses e concentrações diferentes poderiam não apresentar efeito sobre a atividade dessas células.

Dessa forma, pode-se observar que a fagocitose é susceptível a diversas interferências (PAAPE et al., 1996).

Conhecer potenciais influências que medicamentos indicados para o tratamento de vacas secas possam causar à fagocitose pode ser fundamental para optar sobre a adoção deste.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de medicamentos indicados para o

tratamento de mastite no período seco sobre a função fagocítica dos leucócitos lácteos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas seis vacas sem antecedentes de tratamento para mastite nos últimos trinta dias e negativas ao exame bacteriológico do leite. Destas fêmeas colheram-se, assepticamente, vinte amostras com 500 mL de leite distribuídos em frascos do tipo Falcon de 50mL, mantidos a 4°C durante o transporte e processamento das amostras.

Centrifugou-se o leite colhido a 2.100 rpm por vinte minutos (4°C). O sobrenadante mais viscoso formado no espelho da amostra, constituído principalmente de gordura, foi retirado com uma espátula, ou simplesmente teve seus bordos descolados do frasco antes de reverter o conteúdo. Após ser desprezado o restante do sobrenadante, invertendo-se o frasco uma única vez, manteve-se preservado apenas o botão de células formado na superfície inferior. Esse botão foi desprezado através da aspersão gentil de PBS (aproximadamente 2mL de PBS por frasco). Colocaram-se todos os botões de células ressuspensos de cada amostra em outro frasco do tipo Falcon, sendo este homogeneizado e o volume inicial completado com PBS refrigerado (qsp 50mL).

Após uma segunda centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o botão formado desprezado e ressuspensionado em 1mL de meio enriquecido (RPMI 1640) para melhorar as condições de sua preservação.

Para definir se a amostra continha células suficientes para o ensaio de fagocitose e se estas células possuíam vitalidade conveniente (se estavam vivas ou viáveis), uma alíquota de 10 μ L da suspensão celular (células ressuspensionadas em 1mL de RPMI 1640) foi adicionada a 90 μ L de solução de azul de tripan a 0,1 % (MERCK[®]) e realizada a contagem de leucócitos do leite em câmara de Neubauer, no quadrante dos leucócitos, em microscopia óptica (microscópio OLYMPUS[®]) com aumento de 400 \times .

O número total de células contadas no qua-

drante de leucócitos correspondeu à concentração celular da suspensão celular 1, fornecendo-se seu resultado em número de células/mm³, que foi convertido em número de células/mL (multiplicou-se por dez o número obtido na câmara que corresponde ao número de células contadas, correspondente à diluição, novamente multiplicado por dez, que corresponde à altura da câmara e finalmente multiplicado por mil, para ser convertido em mL). Essas etapas foram substituídas por número de células contadas X 10⁵ células/mL.

Para a execução das provas calculou-se a concentração de células viáveis, com o objetivo de obter uma suspensão de células com 2x10⁶ células/mL (suspensão celular 2).

À suspensão celular 2, adicionaram-se os medicamentos antimastóticos utilizados para vacas secas, previamente diluídos 1:1 em RPMI 1640, a saber: cefalônio anidro (M1), gentamicina (M2), benzilpenicilina associada à nafcilina e à dihidroestreptomicina (M3), uma associação entre penicilina, penicilina semissintética e aminoglicosídeo; cloxacilina (M4), uma penicilina semissintética. Empregou-se volume correspondente a 1/100 da dose disponível para um quarto mamário (segundo recomendação do fabricante).

A suspensão celular 2 acrescida do medicamento foi denominada suspensão celular 3, sendo a suspensão celular 2 também usada como grupo-controle. Ambas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora e realizando-se nova avaliação da viabilidade das células presentes.

Para o ensaio de fagocitose foram empregadas placas de poliestireno com 24 poços de 16 mm de diâmetro (COSTAR® 3424), dentro dos quais foram colocadas lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro e, sobre estas, alíquotas de 200 µL da suspensão celular final (após serem mantidas em estufa). Após uma hora em temperatura ambiente, as lamínulas foram lavadas duas vezes com 1,0 mL de RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

A primeira coluna de poços serviu de controle para a técnica com a adição da suspensão celular 2 e de parede de células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* (ZYMOSAN SIGMA®). As demais colunas receberam as amostras de suspensão celular 3 com o Zymosan, sendo um medicamento por coluna. Cada amostra foi plaqueada em duplicata, ocupando duas linhas.

Após a adição de 3µL Zymosan por poço, as placas foram fechadas e incubadas a 37°C durante uma hora, repetindo-se a dupla lavagem dos poços com 1000 µL RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, seguida de fixação com 200 µL de solução de glutaraldeído durante dez minutos. Em seguida, acrescentou-se 1,0 mL de água Milli-Q. Desse modo, as lamínulas estavam prontas para leitura.

Observaram-se as células que fagocitaram as partículas de Zymosan através da leitura das lamínulas em microscopia de contraste de fase NIKON® com aumento de 600x (Figura 1). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células que fagocitaram as partículas de Zymosan.

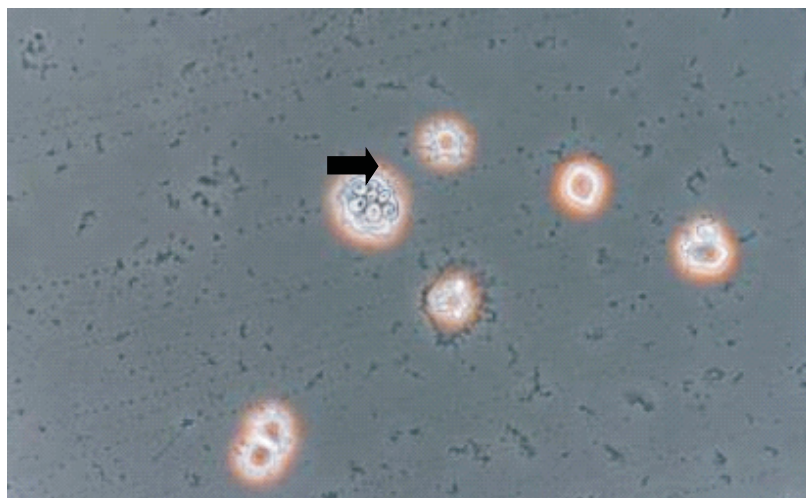


FIGURA 1. Fotomicrografia de fagócito de secreção láctea de vaca, aderida *in vitro*, com partículas de Zymosan no interior do citoplasma, indicando fagocitose, aumento de 600x.

Para a comparação entre os índices médios de fagocitose conforme os diferentes tratamentos e entre estes e o controle, após a constatação da normalidade da distribuição das amostras, utilizando-se do Teste de Kolmogorov-Smirnov, foi empregado o Teste T Pareado. Adotou-se um intervalo de confiança de 95%, com o auxílio do *software* estatístico MINITAB® Release 14.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de não ser novidade o fato de a cura da mastite depender da associação de fatores inerentes ao animal, ao patógeno e ao medicamento (COSTA, 2006), ainda é incomum que o conjunto seja avaliado, principalmente quanto ao hospedeiro (CRISPIE et al., 2004; BARKEMA et al., 2006).

Os medicamentos utilizados para tratamento de vacas no período seco são conhecidos por sua eficácia na secagem da mama e na sua ação contra o agente (OWENS et al., 2001; SHEPHARD et al., 2004; BANSAL et al., 2005). Entretanto essa eficácia não necessariamente está relacionada à

forma como esses agentes atuam na atividade das células de defesa da glândula (NICKERSON et al., 1994; NORCROSS et al., 1996), ainda mais quando se considera a diversidade do período seco (HURLEY, 1989; SANTOS, 2003).

Baseando-se na hipótese de que a eficácia de um medicamento antimastítico, principalmente os indicados para emprego no período seco, não depende apenas de seu efeito antimicrobiano, o presente estudo buscou avaliar a interferência do medicamento (antimicrobiano mais veículo q.s.p.) na função fagocítica, utilizando a técnica de fagocitose *in vitro*.

Conforme apresentado na Figura 2, os índices de fagocitose das células submetidas aos tratamentos 1 e 3 não apresentaram diferenças entre si ou em relação ao controle. Contudo, o índice de fagocitose das células submetidas ao tratamento 4 foi menor do que o controle, assim como ao das células submetidas aos tratamentos 1 e 3. Por sua vez, o índice de fagocitose das células submetidas ao tratamento 2 foi menor que aquele encontrado no controle, assim como ao encontrado nas células submetidas aos demais tratamentos.

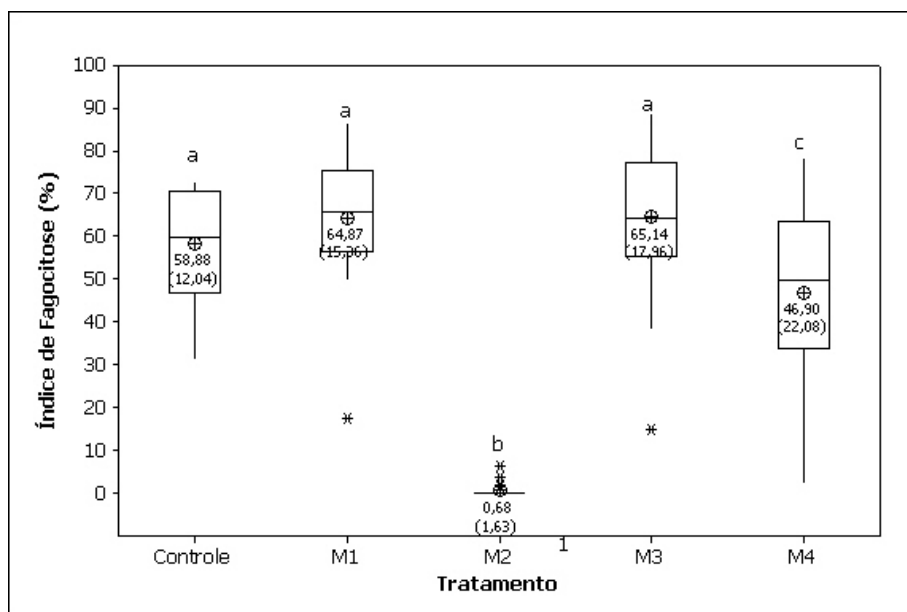


FIGURA 2. Box-plot² do índice de fagocitose (%) de amostras de leite de vacas frente a diferentes medicamentos antimastíticos com indicação para o período seco (São Paulo, 2006).

¹ M1: cefalônio anidro; M2: gentamicina; M3: benzilpenicilina associada à nafcilina e à dihidroestreptomicina; M4: cloxacilina.

² Para distintas letras, diferença com $p \leq 0,05$, pelo Teste T pareado.

Outros autores que também investigaram o efeito de medicamentos nos mecanismos de defesa mamários (NICKERSON et al., 1982, 1986; PAAPE et al., 1990, 1996; DOSOGNE et al., 1998) utilizaram técnicas e preparações diferentes. DOSOGNE et al. (1998) não encontraram interferência na capacidade fagocítica *in vitro* dos fagócitos sanguíneos submetidos à exposição com cefapirina e mecilinamina. No presente estudo, os medicamentos contendo cefalônio anidro e a combinação de benzilpenicilina com nafcilina e diidroestreptomicina também não causaram prejuízo à fagocitose, neste caso empregando-se fagócitos lácteos. É importante atentar para os métodos empregados nos experimentos que avaliam a função fagocítica, pois PAAPE et al. (1996) já referiram diferenças funcionais entre os fagócitos, bem quanto à origem destes (sangue ou leite) e à concentração de medicamento empregada.

LINTNER & EBEHART (1990) observaram que, na presença de secreções mamárias, juntamente com preparações antibióticas, as taxas de ingestão do *S. aureus* foram reduzidas, como se observou nos resultados obtidos com as amostras submetidas aos tratamentos com gentamicina e com cloxacilina, sendo esta última um dos princípios utilizados no estudo mencionado.

Entretanto, no presente estudo, a taxa de fagocitose das células submetidas ao tratamento com a associação entre a benzilpenicilina, a diidroestreptomicina e a nafcilina não foi alterada, o que contradiz os resultados obtidos pelos autores utilizando a mesma combinação.

As contradições não se limitam a diferentes autores. Em estudo realizado utilizando doze preparações antibióticas diferentes, NICKERSON et al. (1982) observaram que a maioria dos antibióticos utilizados produzia efeitos deletérios na função dos fagócitos, mas não observaram essa redução nas amostras submetidas à gentamicina, o que não foi obtido neste estudo. A mesma equipe, em 1986, fez outro estudo com três antibióticos e observaram que as células PMN isoladas de glândulas tratadas com tetraciclina e gentamicina tiveram redução na atividade fagocítica, contradizendo o estudo realizado anteriormente e reforçando os resultados encontrados no presente experimento.

COSTA (2006) afirmou que, em termos práticos, a gentamicina apresenta bons resultados no tratamento da mastite e está presente em muitas preparações comerciais no Brasil. A mesma autora refere que os bons resultados clínicos atribuídos aos aminoglicosídeos (classe a que pertence a gentamicina) contrapõem a reduzida função desses fármacos na presença do leite. Mesmo assim são utilizados, mostrando que o efeito apresentado na função das células de defesa da glândula não está relacionado com os efeitos desejados na secagem e cura da mama.

PAAPE et al. (1990), relataram que, em doses altas e intermediárias, o cloranfenicol tem efeito inibitório sobre a fagocitose. Já o florfenicol e o tianfenicol não apresentam esses efeitos em qualquer concentração testada.

HOEBEN et al. (1997) referiram decréscimo significativo na fagocitose provocado pelo clorfenicol e pela eritromicina. Significante também foi o decréscimo observado nesse estudo pelo medicamento contendo gentamicina na atividade fagocítica das células do presente estudo. Como foi usado o medicamento na forma comercial, esse efeito não pode ser exclusivamente atribuído ao antimicrobiano e sim ao medicamento completo, incluindo o veículo não citado pelo fabricante.

Recomenda-se cuidado em se atribuir o efeito da fagocitose ao antimicrobiano, mas deve-se considerar, principalmente no caso em que são indicadas profilaticamente as aplicações de medicamentos formulados para o período seco em animais não infectados, se esses não poderiam interferir negativamente no processo fisiológico de secagem, quando a fagocitose é fundamental.

CONCLUSÃO

A função fagocítica pode ser prejudicada por alguns dos medicamentos disponíveis no mercado, embora também existam os inócuos a essa função.

AGRADECIMENTOS

À professora doutora Maria Cláudia Araripe Sucupira e à médica veterinária Daniele Yuri Masukado da Silva.

REFERÊNCIAS

- BANSAL, B.K.; DHALIWAL, P.S.; BAJWA, N.S.; RANDHAWA, S.S. Role of selective dry cow therapy in prevention of mastitis in dairy herds with high disease prevalence. In: _____. **Mastitis dairy production: current knowledge and future solutions**. Wageningen Pers: Maastricht, 2005. p. 697-702.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, n. 89, p. 1877-1895, 2006.
- BERRY, E.A.; HILLERTON, J.E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 112-121, 2002.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GORNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 501-515.
- CRISPIE, F.; FLYNN, J.; ROSS, R.P.; HILL, C.; MEANEY, W.J. Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal: a review. **Irish-Veterinary-Journal**, v. 57, n. 7, p. 412-418, 2004.
- DOSOGNE, H.; HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; LOHUIS, J.A.C.M. Effect of cephapirin and mecillinam on the phagocytic and respiratory burst activity of neutrophil leukocytes isolated from bovine blood. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n. 21, p. 421-427, 1998.
- GREEN, M.J.; GREEN, L.E.; MEDLEY, G.F.; SCHUKKEN, Y.H.; BRADLEY, A.J. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2589-2599, 2002.
- HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 56, n. 3/4, p.271-282, 1997.
- HURLEY, W.L. Mammary gland function during involution. **Journal of Dairy Science**, v.72, p. 1637-1646, 1989.
- LINTNER, T.J.; EBERHART, R.J. Effect of bovine mammary secretion during the early nonlactating period and antibiotics on polymorphonuclear neutrophil function and morphology. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 4, p. 524-532, 1990.
- NICKERSON, S.C.; PAAPE, M. J.; HARMON, R. J.; ZIV, G. Effect of antibiotics on bovine milk polymorphonuclear leukocyte viability, phagocytosis and ultrastructure. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. p. 1166, 1982.
- NICKERSON, S.C.; PAAPE, M.J.; HARMON, R.J.; ZIV, G. Mammary leukocyte response to drug therapy. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1733-1742, 1986.
- NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-Pratice**, v. 15, n. 6, p. 8-18, 1994.
- NORCROSS, N.L. Specific defence mechanisms of the udder. **Flemish Veterinary Journal**, v. 62, Suppl. 1, p. 129-39, 1996.
- OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C.; BODDIE, R.L.; TOMITA, G.M.; RAY, C.H. Prevalence of mastitis in dairy heifers and effectiveness of antibiotic therapy. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 814- 817, 2001.
- PAAPE, M.J. Cellular defence mechanisms in the udder. In: **Conf. mastitis: physiology or pathology?** Scientific Program and Abstracts, Ghent Belgio, 1990).
- PAAPE, M.J.; LILIUS, E.M.; WIITANEN, P.A.; KONTIO, M.P.; MILLER, R.H. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 477-482, 1996.
- SANTOS, M.V. Importância do período seco no controle da mastite. In: INTERLEITE – Simpósio INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 6., 2003. Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba, SP: Milkpoint, v.1, p.136-148, 2003.
- SHEPHARD, R.W.; BURMAN, S.; MARCUN, P. A comparative field trial of cephalonium and cloxacillin for dry cow therapy for mastitis in Australian dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10 p. 624- 629, 2004.

Protocolado em: 21 maio 2007. Aceito em: 20 nov. 2008.