EDUARDO DE SOUZA CAMPOS PINHEIRO

Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*

Pirassununga

2016

EDUARDO DE SOUZA CAMPOS PINHEIRO

Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3373
FMVZ

Pinheiro, Eduardo de Souza Campos
Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* / Eduardo de Souza Campos Pinheiro. -- 2016.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Mastite subclínica. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Tratamento. 4. Infecções intramamárias. 5. Vacinação. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Eficácia e avaliação econômica do tratamento e vacinação de mastite crônica causada por Staphylococcus aureus.", protocolado sob o CEUA nº 2433141014, sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/04/2016.

We certify that the proposal "Eficaccy and economic evaluation of treatment and vaccination of chronic mastits caused by Staphylococcus aureus.", utilizing 200 Bovines (200 females), protocol number CEUA 2433141014, under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/06/2016.

Finalidade da Proposta: Ensino

Vigência da Proposta: de 01/2015 a 04/2015 Área: Nutrição E Produção Animal

Procedência:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 10 anos	N:	200
Linhagem:	Holandês			Peso:	500 a 1000 kg		

Resumo: Este estudo tem como objetivos: a) avaliar a eficácia da terapia com antibióticos associada à vacinação, de infecções intramamárias (IIM) crônicas causadas por Staphylococcus aureus(S. aureus)durante a lactação e secagem; b) avaliar a variabilidade genética das cepas de S. aureus de acordo com a resposta ao tratamento, pela técnica de amplificação randômica de DNA polimerase (RAPD); c) avaliar o custo-benefício do tratamento de casos de mastite subclínica crônica causada por S. aureus, pelo modelo estocástico de simulação de Monte Carlo. Para a avaliação da eficácia e custo-benefício da terapia durante a lactação, serão selecionadas 150 vacas com mastite subclínica crônica causada por S. aureus, as quais serão distribuídas aleatoriamente a um dos seguintes tratamentos: a) controle (sem tratamento), b) Intramamário + Injetável, c) Intramamário + injetável + Vacina. Para a mesma avaliação, na secagem, serão selecionadas 150 vacas com mastite subclínica crônica causada por S. aureus, as quais serão distribuídas aleatoriamente a um dos seguintes tratamentos: a) Intramamário, b) Intramamário + Injetável, c) Intramamário + Vacina, d) Intramamário + Injetável + Vacina. Para ambas as terapias (lactação e secagem), a vacina antimastítica será a TopVac (Hipra Espanha), o antibiótico injetável será à base de enrofloxacina, dose única (concentração: 10%; dose: 7,5 mg/kg), e o antibióticointramamário à base de ampicilina (75 e 250 mg, na lactação e na secagem, respectivamente) + cloxacilina (200e 500 mg, na lactação e na secagem, respectivamente).Os isolados de S. aureus serão submetidos à análise de polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica doDNA (RAPD-PCR). A avaliação econômica do tratamento com antibióticos associados com a vacinação será realizada pelo modelo estocástico de simulação de Monte Carlo, que calcula os custos de casos tratados e não-tratados de mastite subclínica crônica causada por S. aureus.

Local do experimento: Fazenda Gameleira - Lagoa Grande/MG

São Paulo, 02 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PINHEIRO, Eduardo de Souza Campos

Título: **Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus***

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

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, família e amigos!!!!! É nóis!!!

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Ana e Roberto Pinheiro. Muito obrigado pelo apoio e amor!!

Agradecimentos

Aos meus amigos, que me aguentaram e me ajudaram a finalizar esse trabalho!! Valeu galera!!

Epígrafe (Dalai Lama)

O home vive relembrando o passado e almejando o futuro, porém não vive o presente.

RESUMO

PINHEIRO, E. S. C. **Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus***. [Treatment and vaccination efficay against bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis]. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Este estudo objetivou avaliar a: a) eficiência da antibioticoterapia associada à vacinação, de infecções intramamárias (IIM) causadas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) durante a lactação e secagem; b) variabilidade genética de *S. aureus* de acordo com a resposta ao tratamento, antibiograma e técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP). Para a avaliação da eficiência da terapia durante a lactação, foram selecionadas 117 vacas com mastite subclínica causada por *S. aureus*, a partir de 5 rebanhos leiteiros, as quais foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: a) controle (sem tratamento), b) antibioticoterapia intramamária + injetável, c) antibioticoterapia intramamária + injetável + vacinação contra *S. aureus*. Para avaliar a eficiência da antibioticoterapia associada à vacinação contra *S. aureus* na secagem, foram selecionadas 136 vacas com mastite subclínica causada por *S. aureus*, as quais foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: a) antibioticoterapia intramamária, b) antibioticoterapia intramamária + injetável, c) antibioticoterapia intramamária + vacina, d) antibioticoterapia intramamária + injetável + vacina. Para os protocolos de tratamento (lactação e secagem), foi utilizada a vacina antimastítica TopVac (Hipra, Espanha). O antibiótico injetável foi a enrofloxacina (Kinetomax®, Bayer, Brasil), dose única (7,5 mg/kg). A antibioticoterapia intramamária durante a lactação foi realizada com ampicilina 75 mg + cloxacilina 250 mg (Bovigam L, Bayer, Irlanda do Norte), e na secagem, com ampicilina 200 mg + cloxacilina 500 mg (Bovigam ®VS, Bayer, Irlanda do Norte). Um total de 117 isolados de *S. aureus* foram submetidos à técnica de AFLP. A taxa de cura dos quartos tratados com antibioticoterapia, durante a lactação e na secagem, foi de 80,5% (n = 82) e 91,5% (n = 106), respectivamente. A vacinação contra *S. aureus* não aumentou a taxa de cura do tratamento durante a lactação, porém reduziu a CCS das vacas vacinada em comparação com as vacas do tratamento controle. No tratamento durante a lactação, primíparas e vacas com apenas um quarto infectado apresentaram maior taxa de cura (79 e 70%, respectivamente) do que pluríparas e vacas com dois ou mais quartos infectados (11 e 17%, respectivamente), respectivamente. A

resistência à penicilina não afetou a taxa de cura dos isolados de *S. aureus*. A probabilidade de um isolado não adaptado à glândula mamária ser multirresistente e resistente à oxacilina foi maior do que a de um isolado adaptado, porém a taxa de cura dos isolados não adaptados foi maior do que a de isolados adaptados. Em conclusão, a antibioticoterapia foi eficiente para tratamento de mastite subclínica causada por *S. aureus* durante a lactação e secagem, e o resultado de antibiograma foi associado à classificação dos isolados em adaptados e não adaptados, porém não foi associado à resposta a antibioticoterapia.

Palavras-chave: Mastite subclínica. *Staphylococcus aureus*. Tratamento. Infecções intramamárias. Vacinação.

ABSTRACT

PINHEIRO, E. S. C. **Treatment and vaccination efficay against bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis.** [Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*]. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The objectives of this study were to evaluate: a) treatment effectiveness, using antibiotics and vaccination, in cows with intramammary infections caused by *S. aureus* during lactation and dry period; b) the genetic variability of *S. aureus* strains according to treatment responses, antibiogram and the AFLP technique. To evaluate the effectiveness of the lactation therapy, 117 icows with *S. aureus* subclinical mastitis, from 5 herds, were randomly distributed into 3 treatments: a) control; b) Intramammary + Injectable; c) Intramammary + injectable + Vaccine. To evaluate the effectiveness of the dry off therapy, 136 cows with *S. aureus* subclinical mastitis were randomly distributed into 4 treatments: a) Intramammary; b) Intramammary + Injectable (INT + INJ); c) Intramammary + Vaccine (INT + VAC); d) Intramammary + Injectable + Vaccine (INT + INJ + VAC). For both therapies (lactation and dry off), the antimastitis vaccine was the TopVac (Hipra, Spain). The injetable antibiotic was enrofloxacin (Kinetomax®, Bayer S. A., Brasil) single dose (7,5 mg/kg). The intramammary therapy was, during lactation, with ampicillin 75 mg + cloxacilin 200 mg (Bovigam L, Bayer, North Ireland) and at dry off with ampicillin 250 mg + cloxacilin 500 mg (Bovigam ®VS, Bayer, North Ireland). *S. aureus* isolates (117) were submitted to the AFLP technique. The cure rate of quarters treated with antibiotics during lactation and dry period was 80,5% (n = 82) e 91,5% (n = 106), respectively. Vaccination against *S. aureus* didn't raise the cure rate during lactation, but lowered the SCC of vaccinated cows compared to control cows. In the lactation therapy, primiparous and cows with one infected quarter had higher cure rates (79 and 70%, respectively) than pluriparous and cows with more than one infected quarter (11 and 17%, respectively), respectively. Resistence to penicillin did not affect *S. aureus* isolates cure rate. The probability of a non adapted *S. aureus* isolate to be multiresistant and resistant to oxacilin was higher than an adapted isolate, but cure rates of non adapted isolates was higher than adapted isolates. In conclusion, antibiotic therapy was efficient to treat *S. aureus* subclinical mastitis during lactation and dry period, and the antibiogram result was associated

with the isolates classification in adapted and non adapted, but was not associated with the response to therapy.

Key words: Subclinical mastitis. *Staphylococcus aureus*. Intramammary infection. Treatment. Vaccination.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MASTITE 20

2.1.1 Mastite clínica 21

2.1.2 Mastite subclínica 23

2.2 PREJUÍZOS CAUSADOS PELA MASTITE 26

2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE 27

2.3.1 Staphylococcus aureus 31

2.3.1.1 Patogênese da mastite 32

2.3.1.2 Fontes de infecção e Epidemiologia 33

2.3.1.3 Prevenção e controle 34

2.3.1.4 Avaliação da variabilidade genética de S. aureus 35

2.4 TRATAMENTO DE MASTITE 36

2.4.1 Tratamento de mastite clínica 37

2.4.2 Tratamento de mastite subclínica 38

2.4.2.1 Tratamento de mastite causada por *S. aureus* 39

2.4.2.2 Vacinação 40

2.4.2.3 Custo-benefício do tratamento de mastite subclínica 42

3 TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NA LACTAÇÃO E SECAGEM 44

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS 44

3.1.1 Seleção dos rebanhos e coleta de amostras 44

3.1.2 Cultura microbiológica e contagem de células somáticas (CCS) 45

3.1.3 Critérios de inclusão e exclusão das vacas 45

3.1.4 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus durante a lactação 46

3.1.5 Avaliação de cura bacteriológica 47

3.1.6 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus na secagem 47

3.1.7 Análise estatística 48

3.1.8 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos 52

3.1.9 Extração de DNA 53

3.1.10 Identificação de S. aureus por PCR convencional 53
3.1.11 Pesquisa do gene mecA 54
3.1.12 Identificação de S. aureus por espectrometria de massa MALDI-TOF 54
3.2 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....55
3.2.1 Visualização dos produtos amplificados 56
3.2.2 Análise de agrupamento dos fragmentos amplificados.....57
3.2.3 Determinação do Índice Discriminatório (DI).....57
3.3 RESULTADOS 57
3.3.1 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus durante a lactação 60
3.3.2 Cura bacteriológica 61
3.3.3 Contagem de células somáticas 64
3.4 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus na secagem.....66
3.4.1 Cura bacteriológica 67
3.5 Antibiograma e AFLP 69
4 Discussão 77
5 CONCLUSÕES 84
REFERÊNCIAS 85

1 INTRODUÇÃO

A mastite subclínica causa diminuição de produção e da qualidade do leite, e pode ser transmitida entre as vacas, quando causada por bactérias contagiosas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A infecção intramamária causada por *S. aureus* é uma das causas mais frequentes de mastite subclínica, que pode persistir por longo período de tempo em vacas leiteiras. Além disso, quando a mastite causada por *S. aureus* persiste na forma subclínica, os quartos mamários infectados atuam como um reservatório de *S. aureus* com alto risco de transmissão para as vacas sadias (LAM et al., 1996; ZADOKS et al., 2001).

Rebanhos leiteiros sem um programa de controle da sanidade da glândula mamária, podem ter aumento da prevalência de mastite causada por *S. aureus*, não só pela baixa resposta à antibioticoterapia, mas também pelo perfil contagioso de transmissão dessa bactéria. A alta prevalência de mastite causada por *S. aureus* nas regiões Sul e Sudeste, correspondentes a aproximadamente 60% da produção de leite do Brasil (EMBRAPA, 2009), foi descrita previamente. Na região da Zona da Mata, Minas Gerais, 98% (47/48) dos rebanhos analisados tinham pelo menos uma vaca infectada por *S. aureus*, sendo que em 77% destes (37/48), cerca de 20% dos quartos mamários estavam infectados por este agente (BRITO et al., 1999). Em estudo no Rio Grande do Sul, *S. aureus* foi o principal microrganismo isolado do leite de vacas que apresentaram mastite clínica e subclínica, correspondendo a 50 e 42% dos isolados, respectivamente (SÁ et al., 2004).

Em rebanhos com alta prevalência de mastite causada por *S. aureus*, a segregação das vacas infectadas pode ser inviável, devido ao tamanho dos lotes, restrições de instalações e dificuldade de ajuste na dieta das vacas. Além disso, nestes rebanhos, o descarte de todas vacas infectadas torna-se inviável. Nestas situações, a despeito de baixas taxas de cura durante a lactação, uma opção para controle de *S. aureus* é o tratamento de parte das vacas infectadas, associado com a implantação de medidas de controle como segregação e descarte das que não curaram. Contudo, para a tomada de decisão sobre a eficiência e custo-benefício do tratamento de mastite causada por *S. aureus*, é necessário levar em consideração os fatores de risco que podem afetar a eficiência da antibioticotearpia, como: a idade da vaca, o total de quartos infectados, a posição do quarto infectado, o estágio de lactação, a gravidade da inflamação, e a intensidade de eliminação das bactérias no leite (OWENS et al., 1988; SOL et al., 1997; DINGWELL et al., 2003).

A baixa taxa de cura dos tratamentos é uma das principais razões para a recomendação de não tratamento de vacas com mastite subclínica causada por *S. aureus* durante a lactação. Na maioria dos casos subclínicos, o tratamento ocorre somente nas vacas (quartos) que apresentam sintomas clínicos ou na secagem (quando todos os quartos mamários recebem antibioticoterapia). Com a crescente pressão para redução da CCS de rebanhos leiteiros, pode não ser economicamente viável esperar até a secagem para tratar vacas com mastite subclínica crônica causada por *S. aureus*, pois a alta prevalência de vacas infectadas aumenta o risco de novas infecções intramamárias. Porém, a antibioticoterapia durante a lactação tem alto custo para o produtor, principalmente pelo descarte do leite. Portanto, estudos sobre protocolos de tratamentos e outros fatores (relacionados à vaca e à bactéria) que afetam a taxa de cura da mastite causada por *S. aureus* podem auxiliar na tomada de decisão de tratamentos em rebanhos com alta prevalência deste agente.

Diversos protocolos de tratamento já foram avaliados para o tratamento de *S. aureus* na lactação e na secagem. O aumento da duração da terapia com antibióticos beta-lactâmicos (WILSON et al., 1972; ZIV; STORPER, 1985) e o tratamento com lincosamida (GILLESPIE et al., 2002; OLIVER et al., 2003) resultaram em maior taxa de cura de mastite subclínica causada por *S. aureus* durante a lactação. A vacinação associada à terapia com antibióticos, para o tratamento de vacas com IIM causada por *S. aureus*, foi avaliada em estudo no Brasil, no qual se utilizou uma bacterina composta por 5 cepas de *S. aureus* (Lavac® Staph, Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) em associação com a aplicação de antibiótico intramamário (AIM) à base de penicilina (Mamizyn® S, Boehringer Ingelhein), para o tratamento de vacas na secagem. Foram aplicadas 2 doses da vacina: no dia da secagem e 14 dias após a secagem. A taxa de cura foi maior ($P < 0,05$) nas vacas vacinadas (74%) do que nas vacas não vacinadas (50%) (SILVA, 2006).

As terapias de curta duração, comumente utilizadas para o tratamento durante a lactação, geralmente resultam em baixa taxa de cura de mastite causada por *S. aureus* (WILSON et al., 1996; BARKEMA et al., 2006). Outros protocolos de tratamento, como terapia estendida ou associação de antibióticos locais e sistêmicos, foram avaliados para aumentar a taxa de cura (TAPONEN et al., 2003; OLIVER et al., 2004; DELUYKER et al., 2005; ROY et al., 2009). Porém, na literatura indexada não foram encontrados estudos que avaliaram a eficiência da terapia estendida em associação com enrofloxacina sistêmica sobre a taxa de cura da mastite subclínica causada por *S. aureus*. A enrofloxacina é um antibiótico que apresenta excelente perfusão tecidual, longo tempo de meia vida no sangue (BROWN, 1996; LIZONDO et al., 1997), e que ao ser degradada pelo fígado é transformada em

ciprofloxacina, um metabólito que mantém a ação bactericida e altas concentrações no sangue e no leite (KAARTINEN et al., 1995; RANTALA et al., 2002). Além disso, o presente estudo avaliou a eficiência do tratamento de infecções subclínica causadas por *S. aureus* durante a lactação e na secagem, associado com vacina contra *S. aureus* (Topvac, Hipra Espanha). Esta vacina é composta por bacterina de cepas de *S. aureus* que apresentavam altos teores de componentes da parede celular, como exopolissacarídeos, que podem estar envolvidos na formação do biofilme (HARRO et al., 2010; PRENAFETA et al., 2010). A capacidade de formação de biofilme e de sobrevivência dentro de células epiteliais e macrófagos, são fatores associados com a maior resistência de *S. aureus* aos antibióticos (ALMEIDA et al., 1996; HEBERT et al., 2000). O objetivo desta vacina é de fazer a vaca produzir anticorpos contra a formação do biofilme (um dos principais fatores de virulência) por *S. aureus*, o que poderia aumentar a capacidade do sistema imune da vaca, assim como a eficiência do(s) antibiótico(s) em eliminar *S. aureus*. Num estudo recente, esta vacina, administrada em 3 doses (45 e 10 dias antes do parto, e 52 dias pós-parto), reduziu a taxa de proliferação de *S. aureus* nos rebanhos em 45% e apresentou moderada eficiência de cura na secagem, com um valor de 41% (SCHUKKEN, 2014).

A taxa de cura de mastite causada por *S. aureus* pode também ser influenciada pela variabilidade genética dos isolados. Características específicas, como fatores de virulência, diferem entre as cepas de *S. aureus*, o que pode alterar as respostas aos tratamentos com antibióticos (BARKEMA, 2006). Dingwell et al. (2004) observaram diferentes respostas, de acordo com a variabilidade genética das cepas de *S. aureus*, ao tratamento com os antibióticos tilmicosina e cloxacilina, na secagem. As cepas predominantes, denominadas A, D e F, responderam similarmente ao tratamento com tilmicosina (71, 75 e 80% de cura, respectivamente), porém diferiram quanto à resposta ao tratamento com cloxacilina (46, 87 e 33% de cura, respectivamente).

As hipóteses do presente estudo foram que: a) a vacinação potencializa a ação dos antibióticos para o tratamento de vacas cronicamente infectadas por S. aureus, b) isolados de S. aureus de um mesmo rebanho apresentam maior similaridade genética do que isolados de rebanhos diferentes, c) a resposta à terapia com antibióticos varia de acordo com a variabilidade genética da cepa de S. aureus presente na glândula mamária da vaca.

O presente estudo teve como objetivos avaliar: a) a eficiência da terapia com antibióticos associada à vacinação, contra infecções intramamárias (IIM) crônicas causadas por S. aureus durante a lactação e na secagem, b) a variabilidade genética das cepas de S. aureus dentro de um mesmo rebanho e entre diferentes rebanhos, c) o efeito da variabilidade

genética das cepas de S. aureus sobre a resposta à antibioticoterapia da mastite, d) a associação entre o agrupamento de isolados que foi feito pela técnica de AFLP e o agrupamento feito pelo antibiograma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MASTITE

A palavra mastite se origina do grego "mastos", glândula mamária, e do sufixo "ite", inflamação, e significa processo inflamatório da glândula mamária. O termo mamite tem o mesmo significado, porém a origem desta palavra é do latin “mamae” (glândula mamária). Portanto ambas as terminologias podem ser usadas para designar a inflamação da glândula mamária.

A mastite pode ser causada por trauma ou lesão na glândula mamária, irritação química, ou mais frequentemente, por infecção por microrganismos, principalmente bactérias. A infecção do tecido mamário ocorre quando microrganismos causadores de mastite penetram pelo canal do teto, multiplicam-se no epitélio alveolar da glândula mamária e liberam toxinas que estimulam uma resposta inflamatória pela vaca (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Após a ativação do sistema inume da vaca, a vasodilatação dos capilares alveolares da glândula mamária aumenta a passagem de fluidos (como soro sanguíneo) e leucócitos para o lúmen alveolar. No interior da glândula mamária, os fluidos vasculares e os agregados de leucócitos-microrganismos podem estar presentes em quantidades que são capazes de alterar visualmente o aspecto físico do leite e/ou da própria glândula, cujo quadro inflamatório é denominado de mastite clínica. Porém, na maioria das vezes em que ocorre infecção intramamária (IIM), essa passagem de fluidos e leucócitos para o interior da glândula mamária não ocorre em intensidade suficiente para alterar o aspecto físico do leite e/ou da glândula. Neste caso, o quadro inflamatório é denominado de mastite subclínica. Na mastite subclínica, o leite está visualmente normal, mas com composição (teores de gordura, proteína, lactose, sódio e cloro) e contagem de leucócitos alterados (HALASA et al., 2007). Uma vaca pode apresentar um quadro de mastite sem que ocorra uma infecção da glândula mamária, ou seja, a glândula pode apresentar-se inflamada mesmo sem o isolamento de microrganismos no leite (IDF, 1987).

2.1.1 Mastite clínica

A forma de apresentação da mastite que é mais facilmente diagnosticada é a clínica, caracterizada pela presença visível de anormalidades no leite e/ou úbere da vaca. O leite de quartos mamários com mastite clínica pode ser aguado ou mais viscoso, com a coloração alterada pela presença de pus, sangue, coágulos, flocos ou grumos. Os quartos mamários e o úbere podem ficar edemaciados, avermelhados e endurecidos, e a vaca pode apresentar um quadro sistêmico, com sintomas como febre, desidratação, fraqueza e inapetência (ROYSTER, 2015).

A mastite clínica é causada principalmente por bactérias, e dependendo do manejo das vacas adotado e do ambiente, pode haver grande variação entre os perfis etiológicos das bactérias causadoras de mastite entre os rebanhos leiteiros. Num estudo realizado por Oliveira e Ruegg (2014), em que foram avaliados 747 casos de mastite clínica (1 quarto mamário por vaca) no estado de Wisconsin, EUA, os resultados de cultura microbiológica do leite indicaram 27,2% das amostras sem crescimento, 35,5% de bactérias gram-negativas, 27,6% de gram-positivas e 9,7% de outros agentes. Os agentes patogênicos isolados com maior frequência foram *Escherichia coli* (*E. coli)* (22,6%), estreptococos ambientais (12,7%) e *Klebisiella* spp. (9%). Em outro estudo norte-americano, foram avaliados 165 casos de mastite clínica, e os resultados da cultura microbiológica do leite foram: 32% sem crescimento, 51% *E. coli*, 8% estreptococos ambientais e 9% outros agentes (ROBERSON, 2008). No Brasil, 2 estudos recentes avaliaram a prevalência de bactérias causadoras de mastite clínica. Um estudo retrospectivo sobre dados de mastite clínica de 18 rebanhos leiteiros da região Sudeste, durante 5 anos, relatou de um total de 2.905 casos de mastite clínica (a vaca foi considerada a unidade experimental) que: 41% das amostras não apresentaram crescimento, 19% tiveram isolamento de coliformes, 12% de estreptococos ambientais, 9% de estafilococos coagulase negativa (ECN) e 4% de *Streptococcus agalactiae* (OLIVEIRA et al., 2015). Outro estudo, avaliou 1.292 amostras de leite coletadas de casos de mastite clínica. Cinquenta e três porcento das amostras não apresentaram crescimento, e os microrganismos isolados em maior frequência foram: *Streptococcus agalactiae* (10.5%), *Streptococcus uberis* (8,0%); *Staphylococcus* coagulase negativa (6.0%), *Streptococcus dysgalactiae* (4.4%); e *Escherichia coli* (4.2%) (TOMAZI et al., 2015).

Quanto à evolução do caso, a mastite clínica pode ser classificada em: subaguda, aguda, hiperaguda e crônica, (Quadro 1).

Quadro 1 – Resumo sobre a evolução do tipo de mastite clínica, de acordo com sinais clínicos da vaca

Caso de mastite	Sinais clínicos	
	Quarto mamário	Sistêmicos
Subaguda	Leve inflamação e vermelhidão. Pouca sensibilidade e aumento de temperatura. Leite com pequenos coágulos ou grumos e maior aquosidade. Pode ocorrer redução da produção de leite.	Ausência
Aguda	Ocorrência de inflamação, vermelhidão e endurecimento de todo o quarto. Sensível ao toque. Leite purulento, com aparência de soro, aguado ou sanguinolento. Súbita e grande redução de produção de leite.	Aumento de temperatura retal, perda de apetite, prostração, redução da função ruminal, desidratação, fraqueza, tremores, diarreia e depressão.
Hiperaguda (mais rara e de desenvolvimento muito rápido)	Similares aos casos agudos.	Mesmos do caso agudo, e: choque, fibrose do úbere, septicemia e extremidades frias.
Crônica. Evolução resultante da não cura dos demais casos, ou condição em uma infecção subclínica).	Desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso e alteração na forma e tamanho do quarto afetado. Ocorrência intermitente e repentina de grumos. Redução da produção do leite.	Ausência de sinais sistêmicos

Fonte: Adaptado Philpot e Nickerson (2000).

Outra forma de classificar os casos de mastite clínica, é pela observação da gravidade do caso. Há mais de 10 anos, um sistema de classificação da gravidade dos casos de mastite clínica (que não leva em consideração a evolução do caso) foi proposto. Esse sistema classifica a gravidade dos casos em: leve, moderado e grave (WENZ et al., 2006).

Casos leves de mastite clínica são aqueles nos quais ocorre apenas alteração visual do leite. A vaca não apresenta alterações sistêmicas e o úbere não fica inchado ou firme. Vacas com mastite leve podem esperar o resultado de cultura microbiológica para serem tratados, pois não necessitam de tratamento imediato. Cerca de 60 a 90% dos casos de mastite clínica são leves (ROBERSON, 2010; WENZ et al., 2006).

Os casos moderados de mastite clínica são aqueles em que o leite e o úbere apresentam-se alterados, e caso apareça algum sinal sistêmico, o caso é classificado como grave (LAGO et al., 2010). Outro sistema de classificação leva em consideração 6 sintomas: leite com coloração de soro sanguíneo, diminuição dos movimentos ruminais, desidratação, aumento de temperatura, taquicardia e taquipnéia. Nesse sistema, os casos em que as vacas apresentam leite anormal e apenas 1 dos demais sintomas citados, são classificados como moderados. Caso a vaca apresente leite anormal e 2 ou mais destes sintomas, o caso é classificado como grave (ROBERSON et al., 2004). Cerca de 10 a 30% dos casos de mastite clínica são moderados (ROBERSON, 2012).

Vacas com mastite clínica grave apresentam: a) leite anormal, b) às vezes inchaço no úbere e c) 2 ou mais sintomas sistêmicos, como diminuição dos movimentos ruminais, desidratação, aumento de temperatura, taquicardia e taquipnéia. Nos casos graves, as vacas devem ser tratadas imediatamente, ou seja, não é recomendado esperar o resultado da cultura microbiológica para que o tratamento seja iniciado, mas ainda assim o leite deve ser coletado para a avaliação microbiológica (ROBERSON, 2012). Frequentemente, os casos de mastite grave são associados à infecções por coliformes, porém foi relatado que esses agentes foram os responsáveis por cerca de apenas 50% dos casos graves de mastite nos rebanhos avaliados, sendo que o restante foi causado principalmente por *Staphylococcus sp. e Streptococcus sp.* (ERSKINE, 2002). Nos casos de mastite clínica grave, recomenda-se o tratamento com: 1) antibióticos intramamários, preferencialmente com ação contra bactérias Gram-negativas (HALLBERG, 2001), 2) antibióticos sistêmicos (WENZ, 2001), 3) anti-inflamatórios esteroidais (ZIV, 1998) e 4) fluidoterapia (OHTSUKA, 1997).

2.1.2 Mastite subclínica

A mastite é mundialmente conhecida como sendo uma das doenças que causa maior prejuízo econômico para os produtores de leite, sendo que aproximadamente dois terços deste

prejuízo é devido à mastite subclínica (SEEGERS et al., 2003; HALASA et al., 2007). A mastite subclínica leva à diminuição da produção de leite, aumento da probabilidade de descarte das vacas e de mastite clínica (REKSEN et al., 2006, 2007). Além disso, vacas com mastite subclínica podem ser uma fonte de infecção para vacas sadias, porque alguns patógenos podem ser transmitidos de uma vaca para outra (LAM et al., 1996; ZADOKS et al., 2001).

A mastite subclínica é definida como a inflamação da glândula mamária que não acarreta em alterações visuais do leite, do úbere e da vaca, ou seja, é uma doença em que os sinais clínicos estão ausentes. A principal forma de detecção desta doença, é pela avaliação do número de células presentes por mL de leite ou pela alteração da composição do leite. As células presentes no leite recebem o nome de células somáticas, e a concentração [contagem de células somáticas (CCS) por mL de leite] destas células no leite é um dos principais indicadores de sanidade da glândula mamária.

Células somáticas são compostas principalmente por células do sistema imune (80% em quartos sadios e 99% em quartos com mastite) (SORDILLO et al., 1997). Essas células somáticas são parte do mecanismo natural de defesa da glândula mamária, e incluem linfócitos, macrófagos, células polimorfonucleares e células epiteliais (PILLAI et al., 2001). Portanto, as células somáticas indicam uma reação à uma infecção intramamária ou à qualquer outro fator que ative o sistema imune.

A CCS é um critério muito comumente usado para distinguir vacas com e sem mastite subclínica. Porém, a elevação da CCS em um quarto mamário indica uma inflamação, e não necessariamente uma infecção neste quarto (DOHOO et al., 2011). Como na maioria das vezes a mastite subclínica é causada por uma infecção intramamária (DJABRI et al., 2002), é frequente a confusão entre os termos mastite subclínica e infecção intramamária (BARKEMA et al., 1997; DELUYKER et al., 2005). O termo infecção intramamária refere-se ao isolamento de microrganismo no interior da glândula mamária (BERRY; MEANEY, 2006), enquanto que mastite subclínica refere-se ao processo inflamatório da glândula, que pode ser diagnosticado pela CCS.

Quando as bactérias penetram na glândula mamária e estabelecem uma infecção, inicia-se uma inflamação, que é acompanhada por: a) influxo de leucócitos, provenientes da corrente sanguínea; b) alteração da função secretória; e c) mudanças no volume e composição da secreção. Como o número de células presentes no leite está altamente associado à inflamação e à saúde da glândula mamária, essa contagem de células somáticas (CCS) é aceita

mundialmente como a medida padrão para se avaliar a qualidade do leite (DOHOO; MEEK, 1982).

A infecção intramamária resulta em resposta inflamatória pela glândula mamária, e essa resposta pode ser medida pela CCS. Qualquer diagnóstico baseado em um único exame é passível de erros, e para minimizar o erro de diagnóstico pela CCS, a sensibilidade e a especificidade devem ser avaliados considerando limites máximos da CCS (SCHEPERS et al., 1997). Estudos prévios na América do Norte e Europa descreveram que quartos sadios apresentaram média de CCS de 70.000 células/mL (DOHOO et al., 1991; LESLIE et al., 1997; SCHEPERS et al., 1997; DJABRI et al., 2002). Ainda que que ocorra variação desta média, também foi demonstrado que a média da CCS de quartos não infectados aumenta com a idade, dias em lactação e diminuição da produção de leite da vaca (SCHEPERS et al., 1997). Porém, em outro estudo a CCS de quartos não infectados não foi influenciada pela idade, stress calórico, e estágio de lactação da vaca (HARMON, 1994). Portanto, para distinguir quartos infectados de não infectados, a maioria dos estudos tem recomendado o uso do limite máximo de 200.000 a 250.000 células/mL para vacas sadias, e a cima deste limite para vacas com mastite subclínica (DOHOO et al., 1991; LAEVENS et al., 1997; LESLIE et al., 1997; SCHEPERS et al., 1997). Para estes limites máximos, a sensibilidade da CCS foi de aproximadamente 75%, enquanto que a especificidade foi de 90% (SCHEPERS et al., 1997).

O principal fator que afeta a CCS (do quarto mamário, da vaca e do tanque de leite) é a infecção da glândula mamária (DOHOO; MEEK, 1982). A CCS de referência de quartos mamários sadios e de vacas não infectadas é geralmente menor que 200.000 por mL, porém pode ser menor que 100.000 para primíparas. Um estudo estimou que 50% das vacas não infectadas apresentavam CCS menor que 100.000 por mL e 80% menor que 200.000 (EBERHART et al., 1979). Em um estudo com 44 vacas não infectadas da primeira até a terceira lactação, a média geométrica da CCS foi de 49.400 por mL (LAEVENS et al, 1997). Portanto, quando a CCS é maior que 200.000 cél/mL é indicativo de inflamação do úbere. Em um estudo, a CCS de quartos não infectados não foi influenciada pela idade, stress calórico, e estágio de lactação da vaca (HARMON, 1994)

O método mais utilizado atualmente para se realizar a CCS é por citometria de fluxo, e diversas técnicas para o uso dessa metodologia já foram descritas (HAGELTORN; SAAD, 1986; ÖSTENSSON et al., 1988; REDELMAN et al., 1988; SAAD; ÖSTENSSON, 1990). Essas técnicas foram predominantemente desenvolvidas para amostras de leite com alta CCS. Além disso, pouca atenção tem sido dada para se padronizar os procedimentos de preparação das amostras. Os procedimentos de preparação das amostras de leite variam desde o uso de

centrifugação das amostras de leite cru (REDELMAN et al., 1988) até a diluição do leite com um tampão hipotônico (HAGELTORN; SAAD, 1986; OSTENSSON et al., 1988).

As células presentes no leite são células em estado terminal, que foram ativadas pela diapedese e fagocitose da gordura e proteína do leite. Essas células são sensíveis à agentes permeabilizantes, o que causa uma drástica alteração no padrão de dispersão frontal e lateral das células. Sabendo disso, Dosogne et al. (2003) propuseram um método para a contagem diferencial dos leucócitos no leite que apresentava efeitos mínimos sobre a morfologia das células do leite, para tentar aproximar ao máximo da composição original de células. Para evitar a alteração da morfologia celular, esses pesquisadores usaram um corante de DNA

A identificação de células no leite bovino pela citometria de fluxo, baseada na dispersão frontal e lateral das células, é difícil porque a fagocitose dos componentes do leite pode alterar o tamanho e a granulosidade intracelular, e os debris celulares podem interferir com o padrão de dispersão das células. Portanto, a maioria das técnicas de citometria de fluxo para a contagem diferencial dos leucócitos no leite são baseadas em marcadores fluorescentes com anticorpos monoclonais contra moléculas CD (conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular usadas para diferenciar variados tipos de células, podendo agir de diferentes modos, geralmente como receptoras ou ligantes) ou marcadores de DNA (HAGELTORN; SAAD, 1986; DARZYNKIEWICZ et al., 1992; KELLY et al., 2000; PILLAI et al., 2001).

A alteração da composição do leite também pode ser usada para detecção de mastite subclínica. Vacas da raça Gir com infecção intramamária e alta CCS apresentaram menor teor de lactose e sólidos não-gordurosos no leite do que vacas sadias (MALEK DOS REIS et al., 2013).

A CCS feita ao nível de quarto mamário e vaca, indica o status inflamatório da glândula mamária. Quando feito ao nível de rebanho ou população, o resultado da CCS do tanque está associado ao processo inflamatório da glândula mamária de cada vaca, mas é mais representativo do status de saúde do úbere do rebanho e da qualidade do leite cru do rebanho (SCHUKKEN et al., 2003).

2.2 PREJUÍZOS CAUSADOS PELA MASTITE

A mastite é uma doença que causa enormes prejuízos à produção leiteira. A mastite, subclínica e clínica, afetam a qualidade e quantidade de leite produzido, e estão associadas à

perdas econômicas (HALASA et al., 2007). A mastite causa prejuízos diretos, como perda a de produção de leite (HORTET; SEEGERS, 1998a), o descarte de vacas (HOUBEN et al., 1994), a alteração na composição do leite (HORTET; SEEGERS, 1998a), as penalidades ou perda de bonificações devido à contagem de células somáticas (ALLORE et al., 1998), os custos com antibióticos (SWINKELS et al., 2005a) e o descarte do leite. Como custos indiretos destacam-se: a diminuição da fertilidade (SCHRICK et al. 2001), o risco de infecção para outras vacas (ZADOKS et al., 2003) e os custos para a indústria de laticínios (HALASA et al., 2007).

O impacto econômico da mastite causada por *S. aureus* é geralmente associado ao aumento na CCS e à queda na produção de leite que essa doença causa. Porém, existem diferenças do impacto que a infecção por *S. aureus* pode causar nos rebanhos, pois em alguns casos a infecção por este patógeno pode estar associada à ocorrência de elevados números de casos clínicos.

2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE

Os principais critérios de classificação dos agentes causadores de mastite, que são isolados com maior frequência na cultura microbiológica, levam em consideração: o reservatório ou fonte de infecção da glândula mamária (outra vaca ou o ambiente), o resultado fenotípico após a coloração pela técnica de GRAM (positivo ou negativo) e a intensidade da resposta imunológica da vaca após a infecção (principais e secundários).

Classicamente, os patógenos causadores de mastite são classificados em “contagiosos” ou “ambientais” (BLOWEY; EDMONDSON, 1995), dependendo da fonte de infecção. Basicamente, os patógenos contagiosos podem ser considerados como microrganismos adaptados para sobreviverem no interior da glândula mamária. Eles são capazes de estabelecer uma infecção subclínica crônica, cuja manifestação se dá tipicamente por aumento na CCS do leite do quarto afetado, com a ocorrência de poucos casos clínicos (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Na maioria das vezes, a transmissão deste patógeno ocorre de uma vaca para outra, principalmente no momento da ordenha, via equipamentos de ordenha, toalhas e mãos de ordenhadores (RADOSTITS et al., 1994). Esses microrganismos são reconhecidos pela sua alta capacidade de adesão, e são capazes de colonizar e se proliferar no canal do teto e no tecido alveolar mamário (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Os principais patógenos

contagiosos são: *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis* (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Quando a mastite é causada por algum destes patógenos recebe o nome de “mastite contagiosa”, e na maioria das vezes, a infecção por estes patógenos tem forma de apresentação subclínica.

As principais bactérias ambientais podem ser agrupadas em coliformes e estreptococcus ambientais. O termo “mastite por coliformes” é frequentemente usado, incorretamente, para se referir à mastite causada por bactérias gram-negativas (HOGAN et al., 2003a). Os principais gêneros classificados como coliformes são: *Escherichia, Klebsiella* e *Enterobacter*. Outras bactérias gram-negativas frequentemente isoladas de infecções intramamárias incluem espécies de *Serratia, Pseudomonas* e *Proteus* (NMC, 1999). Coliformes são bactérias que estão presentes em diferentes locais do ambiente da vaca, mas tem como fonte principal as fezes. *Escherichia coli* é um habitante natural do trato gastrointestinal dos mamíferos. *Klebsiella spp* e *Enterobacter spp* habitam solos, grãos, água e o trato gastrointestinal dos animais. *Serratia marcesens* está presente em muitos dos ambientes habitados por *Klebsiella* e *Enterobacter. Pseudomonas spp* e *Proteus spp* frequentemente contaminam as mangueiras de água da sala de ordenha.

O grupo de bactérias que recebe o nome coletivo de estreptococcus ambientais inclui: *Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae, Enterococcus spp* (HOGAN et al., 2003b) e outros estreptococcus. Este grupo, particularmente *Streptococcus uberis*, já foi isolado de materiais da cama, solo, rúmen, fezes, vulva lábios, narinas, glândula mamária e tetos (BRAMLEY et al., 1982; KRUZE et al., 1982). Silagem de milho e forragens picadas também podem ser fontes de infecção destes patógenos, e infecções do trato reprodutivo podem contribuir para a contaminação do ambiente e dos tetos (PETERSSON-WOLF et al., 2008).

A maioria das infecções causadas por bactérias ambientais ocorre durante o período seco, principalmente nas 2 semanas após a secagem e nas 2 semanas antes do parto, períodos estes de maior imunossupressão da glândula mamária (SORDILLO et al., 2002). Durante a lactação, o maior risco de infecção é logo após o parto, pois nesse momento, devido ao estresse do parto, a vaca apresenta elevada concentração sanguínea de corticoides. Os corticoides promovem diminuição no número, distribuição e função de leucócitos no sangue, além de diminuição na migração de neutrófilos no período pós-parto (PRESLIER et al., 2000; BURTON; ERSKINE, 2003). Patógenos ambientais contaminam o canal do teto entre as ordenhas e podem infectar a glândula mamária no momento da ordenha, caso ocorra um fluxo de leite no sentido do copo coletor para o interior da glândula mamária (BRADLEY; GREEN,

2001). Falha na desinfecção dos tetos antes da ordenha, a presença de contaminação na cânula de aplicação do antibiótico intramamário, e a falha na formação do tampão de queratina no canal do teto, são fatores de risco de novas infecções (HOGAN et al., 2012). Quando a mastite é causada por patógenos ambientais recebe o nome de “mastite ambiental”, e na maioria das vezes, a infecção por estes patógenos resulta no aparecimento de casos clínicos, sem que haja grande elevação na CCS (SMITH et al., 1992).

Devido a algumas diferenças entre os patógenos classificados como contagiosos e ambientais, muitas vezes é possível suspeitar qual dessas classes de bactérias é a mais prevalente no rebanho. Quando microrganismos contagiosos começam a predominar no rebanho, uma elevação da CCS do tanque pode ser observada, sem que haja necessariamente aumento da incidência de casos clínicos. Porém, quando bactérias ambientais começam a predominar no rebanho, geralmente ocorre aumento da incidência de casos clínicos (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Em rebanhos com alta CCS do tanque e elevada incidência de mastite clínica, é possível que as infecções intramamárias sejam causadas por ambas as classes de bactérias (Quadro 2).

Quadro 2 – Características de rebanhos contaminados por patógenos contagiosos e ambientais

Status global de infecção do rebanho		**Média da CCS do tanque**	
		≤ 200.000	**> 200.000**
Número de casos de mastite clínica a cada 100 vacas por ano	**25**	Ideal	Microrganismos contagiosos
	25	Microrganismos ambientais	Microrganismos contagiosos e ambientais

Fonte: adaptado do Centro de Extensão da Universidade de Montreal.

Outra forma usada para classificar os microrganismos causadores de mastite, leva em consideração o resultado fenotípico do agente pela técnica de coloração de GRAM. Essa técnica de coloração permite identificar diferentes espécies de bactérias baseando-se nas propriedades das paredes celulares bacterianas. Bactérias com parede celular espessa, constituída por peptideoglicanos e ácido teicóico, apresentam cor azul violeta após a coloração pela técnica de GRAM (os peptideosglicanos retêm a violeta de genciana, que é um dos corantes usados nesta técnica), e são denominadas “bactérias gram-positivas”. Bactérias com menor quantidade de peptideoglicanos na parede celular não se coram pela violeta de genciana, por isso outro corante também é utilizado na técnica de GRAM, por exemplo a

fuccina, que cora essas bactérias, denominadas “gram-negativas”, de vermelho. A parede celular de bactérias gram-negativas é constituida por lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina que causa intensa reação inflamatória, quando liberada no interior da glândula mamária. Por isso, a maioria das mastites causadas por bactérias gram-negativas resultam em aparecimento de sinais clínicos no leite, no úbere e na vaca (Quadro 3).

Quadro 3 - Principais bactérias e outros patógenos causadores de mastite de acordo com coloração de GRAM

Bactérias gram-positivas	**Bactérias gram-negativas**	**Outros patógenos**
Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Mycoplasma bovis*
Staphylococcus coagulase negativo	*Klebsiella* spp.	*Prototheca*
Streptococcus agalactiae	*Enterobacter* spp.	Levedura
Streptococcus uberis	*Serratia marcesens*	Fungos
Streptococcus dysgalactiae	*Pseudomonas spp*	
Corynebacterium bovis	*Proteus spp*	

Fonte: adaptado do Centro de Extensão da Universidade de Montreal.

A classificação de acordo com a intensidade da resposta imunológica da vaca após a infecção, divide os principais microrganismos causadores de mastite em dois grupos: patógenos principais e secundários. Os patógenos causadores de mastite que são classificados como principais podem ser contagiosos ou ambientais, e são considerados mais virulentos, invasivos e tendem a elevar com maior intensidade a CCS do leite do que os patógenos secundários (Quadro 4). Atualmente, staphylococcus coagulase negativo (SCN) é o grupo de bactérias, classificadas como patógenos secundários, com maior frequência de isolamento na maioria dos rebanhos leiteiros. A mastite causada por SCN resulta, na maioria das vezes, em infecção subclínica ou em mastite clínica leve, com aumento de CCS e sem redução de produção de leite do quarto infectado (TOMAZI et al., 2014). Da mesma maneira, infecções causadas por patógenos secundários como *Corynebacterium bovis* são caracterizadas por aumento moderado de CCS e sem redução na produção de leite do quarto infectado (GONÇALVES et al., 2013).

Quadro 4 – Patógenos principais e secundários que causam mastite em vacas

Patógenos principais	**Patógenos secundários**
Podem causar resposta inflamatória intensa, maior aumento na CCS, redução na produção de leite e até morte da vaca.	Causam resposta inflamatória leve, menor aumento na CCS e sem redução na produção de leite.
Staphylococcus aureus *Streptococcus uberis* *Escherichia coli* *Streptococcus dysgalactiae* *Klebsiella* spp. Outros streptococcus	Staphylococcus coagulase negativo *Corynebacterium bovis*

Fonte: adaptado do Centro de Extensão da Universidade de Montreal.

2.3.1 **Staphylococcus aureus**

Staphylococcus aureus é um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo, imóvel, não esporulado, coagulase-positivo, que causa mastite contagiosa em vacasleiteiras. A mastite causada por *S. aureus*, na maioria das vezes, não apresenta sinais clínicos e evolui para um quadro subclínico crônico. Além disso, essas infecções são geralmente refratárias ao tratamento rotineiramente feito com antimicrobianos intramamários (PHILPOT; NICKERSON, 2000).

Nos anos de 1960, foram publicados os primeiros estudos que serviram como base para as principais medidas de controle contra mastite causada por *S. aureus*. Estas pesquisas estabeleceram padrões para o controle da mastite contagiosa em rebanhos leiteiros (DAVIDSON, 1961; WILSON; DAVIDSON, 1961; NEAVE et al., 1966; DODD et al., 1969; NEAVE et al., 1969). A partir destes estudos foi criado o programa de 5 pontos para o controle da mastite. A implementação desse programa, que mais tarde evoluiu para o programa de 10 pontos do National Mastitis Council (NMC) para o controle da mastite, tem sido eficiente na redução da prevalência de mastite causada por *S. aureus* em rebanhos leiteiros. Esse programa abrange fatores relacionados a todos os agentes causadores de mastite. Para o controle de agentes contagiosos, como *S. aureus*, as principais medidas recomendadas são: adequado procedimento de ordenha das vacas, uso de desinfetante de teto

pós-ordenha (“post dipping”), biossegurança para prevenir a entrada de novos patógenos, e segregação e/ou descarte das vacas cronicamente infectadas. Se o programa de 10 pontos não estiver corretamente ou inteiramente implantado, podem ocorrer falhas no controle de mastite causado por *S. aureus* (BARKEMA et al., 1998b).

Em revisão realizada por Middleton (2013) para o NMC, o autor fez uma retrospectiva do que foi estudado sobre mastite causada por *Staphylococcus aureus* nos últimos 50 anos. Nessa revisão, foram abordados temas como: patogênese da infecção, fontes de infecção e epidemiologia, prevenção e controle desta doença, tratamentos e vacinação. O autor concluiu que as decisões sobre como manejar a mastite causada por *S. aureus* vão depender da contagiosidade, persistência e natureza inflamatória das cepas causadoras da infecção.

2.3.1.1 Patogênese da mastite

A infecção intramamária (IIM) causada por *S. aureus* inicia-se após a entrada deste patógeno pelo canal do teto, e posteriormente para o interior da glândula mamária. A condição da pele dos tetos e danos à queratina do canal do teto podem aumentar os riscos de IIM, sendo que tetos danificados tem maior risco de novas IIM. Após a entrada na glândula mamária, *S. aureus* adere-se às células epiteliais da glândula mamária, diminuindo a chance de ser excretado pela glândula durante a ordenha. A defesa primária contra a IIM por *S. aureus* é a fagocitose, realizada pelos neutrófilos, que são as primeiras células somáticas envolvidas no processo de defesa inespecífica da glândula mamária após uma infecção. Porém, a função fagocítica dos neutrófilos é diminuída na presença de leite, e *S. aureus* produz diversos fatores anti-fagocíticos, como proteína A, presença de cápsula e pseudocápsula, que diminuem a eficiência de fagocitose deste patógeno pelos neutrófilos. Além disso, as concentrações de complemento e de anticorpos opsonizadores, fatores que facilitam a captura de *S. aureus* pelos neutrófilos, são baixas no leite, dificultando ainda mais a eliminação deste patógeno (SUTRA; POUTREL, 1994).

Após estabelecida no interior da glândula mamária, a IIM causada por *S. aureus* pode levar à erosão e ulceração dos sinus e ductos lactíferos, infiltração do tecido do parênquima com células inflamatórias, e por fim lesão nas células epiteliais do tecido mamário (secretoras de leite), levando à oclusão dos ductos e alvéolos e presença de *S. aureus* no seu interior. *S. aureus* que ficam no tecido alveolar, podem ser fonte de infecção para outras regiões da

glândula ou formam granulomas e microabcessos (SUTRA; POUTREL, 1994). O tecido mamário lesado é posteriormente composto por toxinas e enzimas extracelulares produzidas por *S. aureus*, como as toxinas α, β, γ, e δ, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), enterotoxinas, nuclease, coagulase, catalase, hialuronidase, fosfatase, lipase, staphyloquinase e proteases. As toxinas podem ter um efeito direto sobre o tecido ou levam a uma intensa resposta inflamatória pelo hospedeiro, agindo como superantígenos. O papel das enzimas na patogênese da mastite ainda não é muito bem esclarecido, mas acredita-se que elas podem facilitar a adaptação do patógeno para este crescer no leite (SUTRA; POUTREL, 1994).

2.3.1.2 Fontes de infecção e Epidemiologia

A glândula mamária das vacas em lactação é considerada o principal reservatório de infecção de IIM causadas por *S. aureus*. Embora *S. aureus* possa ser isolado de fontes ambientais em fazendas leiteiras, o ambiente da vaca não é considerado o principal reservatório de infecção. O principal modo de transmissão da mastite causada por *S. aureus* é de uma vaca para outra via fômites, como as teteiras do equipamento de ordenha, no momento da ordenha.

Novilhas de reposição também podem ser uma importante fonte de IIMs causadas por *S. aureus*. Em estudo realizado no estado da Louisiana (EUA), foi relatada prevalência de 37% de novilhas infectadas por *S. aureus* no pré-parto (TRINIDAD et al., 1990). A infecção da glândula mamária causada por *S. aureus* pode ocorrer em bezerras novas (6 meses de idade), porém a maioria das IIM ocorre em novilhas que estão no terceiro trimestre de gestação (FOX et al., 1995).

É presumido que a IIM nas novilhas ocorre pela entrada, através do canal do teto, de habitantes da pele do teto para o interior da glândula mamária. Roberson et al. (1998) reportaram que possíveis fontes de *S. aureus* no colostro de novilhas foram: leite das vacas em lactação (70%), locais do corpo da novilha (39%), ambiente (28%), e outras fontes (16%). Similarmente, Middleton e Fox (2002a) reportaram que 71% das cepas de *S. aureus* isoladas da secreção mamária de novilhas no momento do parto foram as mesmas das isoladas do leite de vacas em lactação, e 47% das cepas de *S. aureus* isoladas da pele do teto e do úbere das novilhas foram as mesmas isoladas de secreções mamárias de novilhas no momento do parto.

Uma possível fonte de infecção dos tetos das bezerras por patógenos causadores de mastite são as moscas. Em estudo prévio, foi relatado que “moscas do chifre” (*Haematobia irritans*) foram capazes de transmitir *S. aureus* para novilhas causando IIMs, e que feridas no teto podem ser uma fonte para a colonização de *S. aureus* pelas moscas (OWENS et al., 1998). Rebanhos com eficiente controle de moscas (não permitindo o acúmulo excessivo de matéria orgânica, usando inseticidas “pour-on” e adesivos com inseticida, que ficam colados na orelha e cauda dos animais) tem menor risco de ocorrência de mastite causada por patógenos contagiosos em novilhas no início da lactação do que rebanhos sem controle de moscas (NICKERSON et al., 1995; PIEPERS et al., 2011).

A entrada de novas bezerras e vacas no rebanho também é um importante fator de risco para a IIM causada por *S. aureus*. Para reduzir esse risco sanitário, os produtores preferem comprar novilhas ao invés de vacas em lactação. Porém, rebanhos que crescem a partir da compra de novilhas podem ter maior prevalência de IIM causadas por *S. aureus* do que rebanhos que crescem a partir da compra de vacas em lactação (MIDDLETON et al., 2002b). Além disso, rebanhos que compram novilhas podem apresentam maior número de cepas de *S. aureus* e maior número de novas cepas de *S. aureus* entrando no rebanho do que rebanhos fechados que criam suas próprias novilhas (MIDDLETON et al., 2002b).

Com o uso de técnicas de biologia molecular para a tipificação das cepas bacterianas, baseadas no exame do DNA, foi observado que existem diferentes cepas de *S. aureus*, sendo que na maioria dos rebanhos existe uma cepa que é predominante (MIDDLETON et al., 2002c). Também foi observado que existem diferenças entre as cepas, no que diz respeito à transmissibilidade, inflamação do úbere, persistência da infecção e impacto na produção de leite (MIDDLETON; FOX, 2002ª; BARKEMA et al., 2006).

2.3.1.3 Prevenção e controle

O objetivo do programa de controle para a mastite causada por *S. aureus* é de prevenir novas IIM ou facilitar a redução das novas IIM o mais rápidamente possível. Como a glândula mamária da vaca é o reservatório primário da infecção e a transmissão ocorre no momento da ordenha, o principal foco para prevenir a mastite causada por *S. aureus* tem sido a higiene no momento da ordenha, isso inclui: usar uma toalha por úbere; fazer com que os ordenadores usem luvas; e emergir os tetos das vacas, após a ordenha, em uma solução germicida para

eliminar *S. aureus* que pode ter colonizado a pele do teto por fômites, como as teteiras, durante a ordenha. Outras medidas de controle incluem: segregação e ordenha das vacas infectadas após as vacas não-infectadas; descarte das vacas cronicamente infectadas; adequada manutenção do equipamento de ordenha; e avaliação das novilhas de reposição e das vacas em lactação compradas antes da entrada desses animais com as vacas lactantes do rebanho. Além disso, o uso rotineiro de antibióticos intramamários de longa ação durante o período seco contribui para eliminar IIM existentes. Apesar da higiene no momento da ordenha ser a principal medida de controle, em alguns casos isso não é o suficiente durante um surto desta doença (SMITH et al., 1998). Nesses casos, medidas mais agressivas como descarte precoce de vacas infectadas e secagem dos quartos mamários infectados podem ser necessárias (MIDDLETON et al., 2001). A decisão de tratar vacas infectadas durante a lactação vai depender do histórico de contagiosidade da doença no rebanho e da resposta aos tratamentos prévios.

Existem diferenças entre as cepas de *S. aureus*, e isso faz com que as decisões para o controle desta doença variem de um rebanho para o outro. Alguns rebanhos apresentam somente uma cepa predominante, o que sugere que a contaminação (que posteriormente pode levar à infecção) ocorre de uma vaca para outra. Outros rebanhos apresentam poucas vacas infectadas, mas por diferentes cepas de *S. aureus*, sendo que não há nenhuma cepa predominante causando as IIM nas vacas, o que sugere que essas cepas de *S. aureus* não são adaptadas à glândula mamária, e podem ser consideradas como patógenos não contagiosos, assim como os patógenos ambientais. Portanto, decisões de manejo das vacas infectadas, por exemplo segregação e ordenha, tratamento e/ou descarte podem variar entre rebanhos de acordo com a capacidade de adaptação da cepa predominante.

2.3.1.4 Avaliação da variabilidade genética de S. aureus

Com o uso de técnicas de biologia molecular para a tipificação das cepas bacterianas, baseadas no exame do DNA, foi observado que existem diferentes cepas de *S. aureus*, sendo que na maioria dos rebanhos existe uma cepa que é predominante (MIDDLETON et al., 2002c). Também foi observado que existem diferenças entre as cepas, no que diz respeito à transmissibilidade, inflamação do úbere, persistência da infecção e impacto na produção de leite (MIDDLETON; FOX, 2002a; BARKEMA et al., 2006).

S. aureus apresenta grande variedade genética entre as cepas, conforme descrito por diferentes métodos de diagnóstico molecular (AARESTRUP et al., 1995; ZADOKS et al., 2002b; SMITH et al., 2005). As cepas deste agente diferem-se entre si com relação à capacidade de transmissão para outras vacas dentro do mesmo rebanho (SMITH et al., 1998), de aumentar a CCS, de causar mastite clínica ou infecções persistentes (ZADOKS et al., 2000; HAVERI et al., 2005b), diminuir a produção de leite (MIDDLETON; FOX, 2002a), e responder ao tratamento com antibióticos (DINGWELL et al., 2004).

Diversas técnicas foram usadas para dividir *S. aureus* em diferentes grupos, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (DINGWELL et al., 2004), Tipificação de Sequências Multilocus (SMITH et al., 2005), amplificação por PCR do espaçador intergênico 16S-23S rRNA (GRABER et al., 2009), genotipagem da cápsula (PCR), ensaios de invasão (células epiteliais bovinas) e produção de biofilme (Espectrofotometria) (BARDIAU et al., 2016). Todas essas técnicas foram capazes de diferenciar grupos de *S. aureus* que foram mais frequentes em todos os rebanhos, portanto foram considerados adaptados à glândula mamária.

Estudos que avaliaram *S. aureus* de diferentes partes do mundo, sugeriram que poucos clones adaptados à glândula mamária são responsáveis pela maioria das IIMs (KAPUR et al., 1995; ZADOKS et al., 2002). Smith et al. (2005), ao avaliarem *S. aureus* de diferentes países (Estados Unidos, Reino Unido e Chile), encontraram um complexo clonal (CC97) que foi comum em 87,4% de todos os isolados. Os autores concluíram que um único grupo clonal de *S. aureus* alcançou distribuição mundial e é responsável pela maioria das IIMs. Graber et al. (2009), encontraram uma cepa de *S. aureus* (Genótipo B), que foi associada à altas prevalências de IIMs em rebanhos e vacas da Suiça, enquanto que as cepas Genótipo C e Genóticpo G foram associadas à baixas prevalências nos rebanhos. Bardiau et al. (2016) avaliaram *S. aureus* de 4 países (Bélgica, Canada, Itália e Suiça), e dividiram os isolados em 2 grupos: *cap*8-*agr*II, que demonstraram baixa taxa de invasão; e *cap*5-*agr*I, que demonstraram alta taxa de invasão.

2.4 TRATAMENTO DE MASTITE

A mastite é a principal razão para o uso de antibióticos nas fazendas leiteiras (POL et al., 2007), e existe um crescente apelo para a redução do uso de antibióticos em animais de produção, portanto é necessário que a utilização de antibióticos pelos produtores seja criteriosa. Diversos estudos identificaram fatores de risco que afetaram a taxa de cura do

tratamento de mastite clínica, como idade, ordem de parto, DEL, CCS, histórico de mastite clínica e fatores associados ao patógeno, como virulência e susceptibilidade aos antibióticos (SOL et al., 2000; CONSTABLE et al., 2002; BRADLEY et al., 2009; PINZÓN-SANCHEZ et al., 2011). Conhecendo-se esses fatores, a primeira decisão que precisa ser tomada é se o caso de mastite em questão deve ser tratado ou não. Além desses fatores, foi observado que 10 a 40% dos casos de mastite clínica não apresentam crescimento microbiológico quando feita a cultura do leite (BARTLET et al., 1992; OLDE et al., 2008), e nesses casos o uso de antimicrobianos pode não ser necessário. O tratamento com antibiótico deve ser realizado apenas nos casos em que seu uso é justificável, ou seja, quando a taxa de cura com antibiótico for maior do que a taxa de cura espontânea.

Um estudo retrospectivo verificou a taxa de cura espontânea de IIMs e a taxa de cura que pode ser alcançada com a terapia com antibióticos IMs (WILSON et al., 1999). Somente casos de mastite subclínica foram incluídos nas análises. Um caso de mastite foi definido como crescimento de microrganismo na cultura de leite de rotina das vacas, e a cura foi definida como ausência de crescimento de microrganismos na cultura do mês seguinte. Os protocolos de tratamento não foram descritos. Vinte e um patógenos foram isolados de 9.007 amostras de cultura. A taxa de cura espontânea (sem tratamento com antibiótico) foi de 65% (4206/6481), e a taxa de cura das vacas tratadas com qualquer antimicrobiano foi de 75% (1891/2526). A diferença entre as taxas de cura foi de 10%, ou seja, 10 vacas precisaram ser tratadas com antibióticos IMs para que 1 vaca a mais fosse curada do que se nenhuma vaca fosse tratada.

2.4.1 **Tratamento de mastite clínica**

Nas últimas décadas, tem sido discutido o tratamento de mastite clínica de acordo com o patógeno causador da mastite e a gravidade do caso. Dessa forma, a utilização desnecessária de antibióticos pode ser reduzida.

O tratamento de mastite clínica direcionado para o patógeno causador pode aumentar a taxa de cura do tratamento e reduzir o uso inadequado de antibióticos. O tratamento com ceftiofur apresentou maior taxa de cura do que o tratamento com cefapirina (79 vs. 50%) contra mastite clínica causada por bactérias GRAM negativas (SCHUKKEN et al., 2013). O uso inadequado de antibióticos pode representar cerca da metade dos tratamentos de mastite

clínica (ROBERSON 2008)). Alguns pesquisadores acreditam que o tratamento de casos de mastite que: a) não apresentaram crescimento na cultura microbiológica, b) foram leves e causados por *E. coli*, e c) foram tratados com antimicrobiano que o isolado apresentou resistência *in vitro*; seja desnecessário (ROBERSON 2012). Portanto, o tratamento de mastite clínica baseado no resultado de cultura microbiológica pode resultar em maior taxa de cura e redução no uso de antimicrobianos, porém a logística para envio de amostras para o laboratório e o tempo para a entrega do resultado para o produtor podem impossibilitar essa estratégia de tratamento. Uma alternativa seria o treinamento de funcionários para a realização de cultura microbiológica na propriedade leiteira.

A anotação da gravidade dos casos de mastite clínica pode auxiliar na tomada de decisão do tratamento. Casos leves e moderados de mastite clínica podem aguardar o resultado de cultura microbiológica (se o resultado for entregue em 24 horas) e devem ser tratados apenas quando forem causados por estreptococcus, estaphylococcus (o tratamento contra *S. aureus* deve ser avaliado com maior critério) e *Corynebacterium spp* (ROBERSON, 2012). Casos graves de mastite devem ser tratados imediatamente, com antibiótico IM, antibiótico sistêmico (para prevenir septicemia) e terapia suporte (fluidoterapia e anti-inflamatórios) (ROBERSON, 2012), pois cerca de 15% das vacas que apresentaram mastite clínica grave morreram (ERSKINE et al., 2002).

2.4.2 Tratamento de mastite subclínica

O tratamento de mastite subclínica deve ser avaliado com critério, pois o sucesso da terapia depende do protocolo de tratamento, e fatores relacionados à vaca e à bactéria (BARKEMA et al., 2006). Além disso, o descarte de leite e a baixa taxa de cura podem não viabilizar o tratamento, portanto o custo-benefício da terapia deve ser considerado (SWINKELS et al., 2005a; STEENEVELD et al., 2007).

Os resultados do tratamento de mastite subclínica durante a lactação podem ser variáveis. A taxa de cura do tratamento com cefapirina por 2 dias foi maior do que a taxa de cura espontânea (53 vs. 30%) (ROSENBERG et al., 2002), e o tratamento com esse mesmo antibiótico, aplicado por 1 dia, apresentou taxa de cura semelhante ao tratamento por 5 dias com ceftiofur (61 vs. 73%, para as vacas tratadas com cefapirina e ceftiofur, respectivamente) (SCHUKKEN et al., 2013) A eficiência da terapia com ceftiofur também foi avaliada em

outros estudos. Um grupo de vacas não foi tratado (controle) e outros 3 grupos de vacas foram tratadas por 2, 5 e 8 dias. A taxa de cura dos grupos controle, 2, 5 e 8 dias de tratamento foi de 11, 39, 54 e 66%, respectivamente. Todas as vacas tratadas apresentaram maior taxa de cura que o controle, e vacas tratadas por 8 dias apresentaram maior taxa de cura que vacas tratadas por 2 dias (OLIVER et al., 2004). O tratamento de mastite leve e moderada, causada por bactérias GRAM negativas, com ceftiofur IM por 5 dias, resultou em maior taxa de cura do que o não tratamento com nenhum antibiótico (73 vs. 38%) (SCHUKKEN et al., 2011). Porém um estudo demonstrou que não houve benefício no tratamento de mastite subclínica causada por *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (SANDGREEN et al., 2006).

2.4.2.1 Tratamento de mastite causada por *S. aureus*

Em rebanhos com vacas infectadas por *S. aureus*, para obter sucesso no programa de controle da sanidade da glândula mamária, é necessário que as vacas e novilhas infectadas por este agente sejam identificadas o mais rapidamente possível, e medidas para reduzir a transmissão entre vacas devem ser tomadas (ZADOKS et al., 2002a). Tais medidas incluem: segregação, descarte e tratamento das vacas infectadas. Porém, em rebanhos com alta prevalência de mastite causada por *S. aureus*, o descarte de todas as vacas infectadas pode ser economicamente inviável e a segregação pode ser complicada, por limitações de mão-de-obra e instalações (WILSON et al., 1995; SEARS, 2002). Desta forma, o tratamento das vacas infectadas por *S. aureus* pode ser uma opção para redução da prevalência de *S. aureus* nestas situações.

Devido ao interesse em diminuir a prevalência *de S. aureus* em rebanhos leiteiros, alguns estudos avaliaram o tratamento de novilhas, e existe uma crescente disponibilidade de medicamentos para o tratamento mastite subclínica causada por *S. aureus* na lactação (e.g., BORM et al., 2005; DELUYKER et al., 2005). O interesse por tratamento também pode estar associado às exigências governamentais para redução da CCS, ou bonificação/penalização pela indústria (ALLORE et al., 1998). Porém, os resultados de taxa de cura de mastite causada por *S. aureus* podem variar de 4 a 92% (SCHALLIBAUM et al., 1981; REMMEN et al., 1982; ZIV; STORPER, 1985; OWENS et al., 1988, 1997; TIMMS, 1995).

As taxas de cura para mastite crônica causada por *S. aureus* variam de acordo com características da vaca, do patógeno, e do protocolo de tratamento (BARKEMA, 2006). Com relação à vaca, as taxas de cura diminuem: com o aumento do número de partos da vaca (TAPONEN et al., 2003b), aumento da contagem de células somáticas (CCS) (OWENS et al., 1988), aumento da contagem bacteriana antes do tratamento (DELUYKER et al., 2005) e aumento do número de quartos infectados (JANOSI et al., 2001). A taxa de cura para este agente é menor nos quartos traseiros do que nos dianteiros (DELUYKER et al., 2005). Sol et al. (1997) correlacionaram fatores inerentes à vaca com a taxa de cura para IIM subclínicas causadas por *S. aureus*. A partir dos resultados obtidos por um modelo de regressão, foi possível determinar a probabilidade de cura de um animal com IIM subclínica por *S. aureus*. Por exemplo; a probabilidade de cura de uma vaca com mais de 2 partos, tratada aos 150 dias em lactação (DEL), com um quarto posterior infectado e CCS de 2.000.000 células/ml é de aproximadamente 1%: 1/1{1 + exp[-1 x (0.40 - 1.25 - 1.05 - 1.53 -0.95)]}. Desta forma, vacas com essas características não deveriam ser tratadas, mas sim segregadas, descartadas ou não ter o quarto infectado ordenhado (MIDDLETON; FOX, 2002a). Por outro lado, uma novilha, com um quarto anterior infectado, 220 DEL e CCS de 500.000 cél/ml, tem 61% de chance de curar: 1/1{1 + exp[- 1 x (0.40)]}.

A duração do tratamento é um importante fator que afeta a taxa de cura de *S. aureus* (BARKEMA, 2006). A antibioticoterapia estendida por 5 a 8 dias, resultou em maior taxa de cura do que a terapia por 2 a 3 dias (GILLESPIE et al., 2002; DELUYKER et al., 2005). Porém, quanto maior for a duração do tratamento, maior o volume de leite descartado, e muitas vezes o tratamento pode não ser eficiente. Além da duração da terapia, o sucesso do tratamento depende da cepa invasora e do animal hospedeiro (BARKEMA, 2006).

2.4.2.2 Vacinação

A vacinação contra mastite causada por *S. aureus* tem sido estudada por muitos anos, porém nenhuma vacina estudada até a presente data foi consistentemente eficiente em prevenir novas infecções IIMs causadas por *S. aureus*. Além de prevenir novas IIMs, é desejável que a vacinação também diminua a duração da IMM, ou seja, que *S. aureus* seja eliminado o mais rápido possível após a infecção. Uma vacina multivalente, composta por paredes celulares lisadas de cepas de *S. aureus* que comumente causavam mastite nos EUA,

foi estudada por muitos anos ((Lysigin, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.). Williams et al. (1966, 1975) observaram redução na taxa de novas IIM entre vaca vacinadas e não vacinadas. Vacas vacinadas apresentaram menor CCS e menos casos de mastite crônicas após a infecção experimental IMM com *S. aureus* do que vacas não vacinadas. Em estudo a campo, Williams et al. (1966) observaram redução na taxa de novas IIM entre vacas vacinadas e não vacinadas, porém ainda ocorreu IIM em algumas vacas vacinadas.

Em estudo mais recente, a eficiência da fórmula já existente da vacina Lysigin foi comparada com duas novas fórmulas (MIDDLETON et al., 2006). Após infecção experimental, vacas vacinadas com a fórmula já existente da vacina apresentaram menor duração dos casos de mastite clínica do que o tratamento controle (tratamento controle: primíparas que não receberam vacina). Porém, não houve diferença na CCS, produção de leite e níveis de anticorpos opsonizadores no leite entre os grupos de vacas vacinadas e o controle. Um estudo feito na sequência, a campo, demonstrou que em rebanhos com prevalências de 5% de *S. aureus* e 40% de estafilococcus coagulase negativa, a vacina não reduziu a taxa de novas IIM causadas por estafilococcus, e pode não ter induzido a opsonização dos anticorpos no leite para facilitar a fagocitose e eliminação de estafilococcus da glândula mamária (MIDDLETON et al., 2006). Contrariamente, Nickerson et al. (1999) observaram 45% de redução de novas IIM, em comparação ao controle, quando vacinaram (com Lysigin) novilhas aos 6 meses de idade, 2 semanas após e depois a cada 6 meses até o parto. Além disso, novilhas vacinadas apresentaram redução de 30% de novas IIM causadas por SCN ao parto, em comparação ao controle.

A vacinação com Lysigin também foi estudada como adjuvante ao tratamento com antibióticos. Em um estudo, vacas vacinadas com Lysigin e tratadas com terapia IM estendida com pirlimicina apresentaram maior taxa de cura que vacas não vacinadas (SMITH et al., 2006). Porém, dois estudos avaliaram o efeito do tratamento com a vacina Lysigin em conjunto a terapia estendida com pirlimicina versus o tratamento com apenas a terapia estendida com pirlimicina, e não foi encontrado duferença na taxa de cura entre os grupos em ambos os estudos (LUBY; MIDDLETON, 2005; MIDDLETON et al., 2007).

Recentemente foi produzida uma vacina composta por bacterinas de *S. aureus* (Top Vac, Hipra, Espanha), cuja função foi produzir anticorpos contra a formação do biofilme por *S. aureus*, aumentando a capacidade do sistema imune da vaca, assim como a eficiência do(s) antibiótico(s) em eliminar *S. aureus*. Num estudo recente, esta vacina (administrada em 3 doses: 45 e 10 dias antes do parto, e 52 dias pós-parto) reduziu a taxa de proliferação de *S.*

aureus em 45%, e apresentou moderada eficiência para cura, de 41%, na secagem (SCHUKKEN, 2014).

2.4.2.3 Custo-benefício do tratamento de mastite subclínica

Alguns modelos foram utilizados para avaliar a relação custo-benefício do tratamento de mastite subclínica, como o determinístico e o estocástico. A relação custo-benefício do tratamento com antibióticos para infecções subclínicas causadas por *Streptococcus dysgalactiae* ou *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) foi avaliada por um modelo determinístico, que utilizou dados únicos. Outra forma de fazer essa avaliação, é pelo modelo estocástico, que utiliza intervalos (SWINKELS et al., 2005b).

Para o modelo determinístico, os valores das variáveis de entrada (como duração da infecção, custo com antibióticos e perda da produção de leite) são fixos. No entanto, a decisão de tratar uma vaca com mastite subclínica crônica é tomada em uma situação com muita variação e incerteza. Há muita variabilidade de valores de entrada e nos efeitos de tratamento ou nenhum tratamento. Portanto, a modelagem estocástica pode ser útil, uma vez que inclui a variação nas variáveis de entrada (SWINKELS et al., 2005b).

A modelagem estocástica já foi sugerida em outros estudos relacionados à saúde animal (DIJKHUIZEN et al., 1991), e foi utilizada em estudos prévios (ØSTERGAARD et al., 2005; VOSOUGH-AHMADI et al., 2006; HUIJPS; HOGEVEEN, 2007). Num primeiro estudo, quando foi utilizado o modelo determinístico, a opção de se tratar uma vaca com mastite subclínica causada por *S. uberis* resultou em lucro médio de 11,62 euros por caso tratado (SWINKELS et al., 2005b). Porém, num segundo estudo, foi utilizado o modelo estocástico e os resultados foram diferentes. As vacas tratadas tiveram um custo médio de 11 euros a mais do que as não tratadas (HOGEVEEN et al., 2007). Isso ocorreu, principalmente, devido ao fato das variáveis de entrada terem sido distribuídas nesse segundo estudo estocasticamente, diferentemente dos valores médios determinísticos usados no primeiro estudo. Por exemplo, o custo do descarte de vacas no modelo determinístico (primeiro estudo) foi um valor fixo de 526 euros (SWINKELS et al., 2005b). No segundo estudo, o custo foi específico por caso, e em média uma vaca descartada custou 359 euros. Neste segundo estudo, os resultados da análise de sensibilidade mostraram que com um valor fixo de 526 euros para

o descarte de vacas, os custos de tratamento tornam-se rentáveis, assim como no primeiro estudo de Swinkels et al. (2005b).

3 TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NA LACTAÇÃO E SECAGEM

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Seleção dos rebanhos e coleta de amostras

Foram selecionados cinco rebanhos leiteiros com histórico prévio de alta prevalência de mastite causada por *S. aureus* (aproximadamente 40% das vacas com *S. aureus*). Os rebanhos totalizaram 950 vacas leiteiras, todas mestiças da raça Holandesa x Gir, alojadas em sistema semi-confinado, com média anual de produção de 22 Kg de leite/dia por vaca. Em todos os rebanhos, as vacas foram ordenhadas mecanicamente 2 vezes por dia, com medição automática individual de produção de leite, e foi feita a segregação do lote de vacas com IIM causada por *S. aureus*, as quais foram ordenhadas ao final da cada ordenha, após a ordenha das vacas não infectadas por *S. aureus*.

Para identificação de vacas com IIM causada por *S. aureus*, foram coletadas três amostras compostas de leite (uma amostra por vaca, de todos quartos mamários) (n=2.850), com intervalo entre as coletas de uma semana, de 950 vacas em lactação, para cultura microbiológica. Foram identificadas 420 vacas com isolamento positivo de *S. aureus*, das quais foram coletadas amostras individuais de leite dos quartos mamários (n = 1510) para as análises de cultura microbiológica e CCS.

Para a coleta asséptica das amostras de leite submetidas à cultura microbiológica, os procedimentos foram: imersão dos quartos em solução de iodo 0,5%, e decorridos 30 segundos, secagem dos mesmos com papel-toalha descartável. Em seguida, foram desprezados os três primeiros jatos de leite de cada quarto mamário. As amostras foram coletadas diretamente em tubo estéril, e imediatamente resfriadas em gelo a 5-7 ºC e posteriormente congeladas a -20 ºC até a realização da cultura microbiológica.

Logo após a coleta de amostras de leite para cultura microbiológica, foram coletadas amostras de leite de cada quarto mamário para realização de CCS. Adicionalmente, foram coletadas amostras compostas de leite dos quatro quartos mamários, representativas da

ordenha completa das vacas, para análise de CCS em nível de vaca. As amostras para análise de CCS foram conservadas com bronopol e armazenadas em geladeira a 5-7 ºC até a análise.

3.1.2 Cultura microbiológica e contagem de células somáticas (CCS)

A cultura microbiológica do leite para isolamento de agentes causadores de mastite foi feita de acordo com a metodologia proposta pelo NMC - National Mastitis Council (2004). Resumidamente, foram inoculados 10 μL de leite em ágar com 5% de sangue. Em seguida, a placa foi incubada invertida à 37°C. O padrão de crescimento bacteriano foi observado a cada 24 horas por 3 dias. De acordo com a avaliação das placas, as bactérias foram presumivelmente identificadas conforme a morfologia das colônias (cor, aspecto, tamanho e presença de hemólise) e observação por microscopia após coloração de Gram. Após observação das características morfológicas e atividade hemolítica das colônias, as bactérias foram submetidas às provas enzimáticas do hidróxido de potássio e catalase. Os isolados presumivelmente identificados como estafilococos Gram-positivos foram submetidos à prova de coagulase e látex.

Os isolados bacterianos foram classificados como *S. aureus* quando apresentaram reação negativa ao hidróxido de potássio, positiva à catalase, positiva à coagulase e positiva ao látex, conforme recomendação do National Mastitis Council (2004). Todos os isolados de *S. aureus* foram armazenados em meio com “Brain and Heart Infusion” (BHI) glicerinado e congelados a -80°C, para análises posteriores.

As amostras de leite para análise de CCS foram enviadas para o Laboratório Clínica do Leite – Departamento de Produção Animal da ESALQ-USP (Piracicaba-SP). A CCS foi feita por citometria de fluxo (Fossomatic ™ FC, FOSS, 2008).

3.1.3 Critérios de inclusão e exclusão das vacas

Todas as vacas em lactação com isolamento de *Staphylococcus aureus* na cultura microbiológica nas amostras de leite de quartos mamários foram incluídas no estudo. As vacas com gestação confirmada a cima de 4 meses foram selecionadas para a terapia de secagem, enquanto as demais receberam a terapia de lactação.

Após a seleção, as vacas foram removidas do estudo nas seguintes situações:

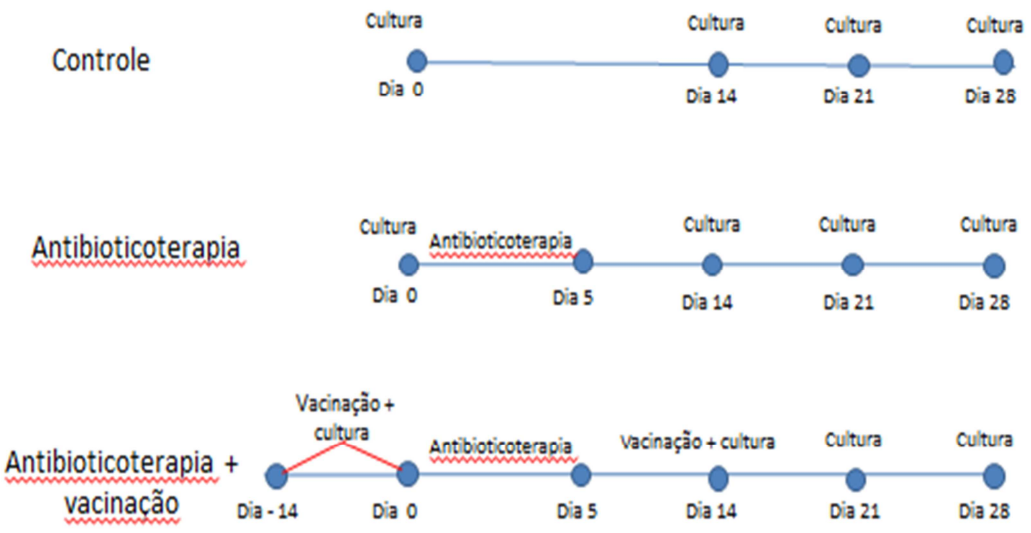
a) Ocorrência de um efeito adverso, seja uma injúria ou doença, que não tenha relação com a mastite, necessitando de outro tratamento com antibiótico.
b) Não ter sido tratada com a dose ou duração correta dos antibióticos.
c) Contaminação das amostras coletadas durante o período experimental.
d) Perda de informações que impediram a interpretação dos resultados.
e) Descarte da vaca por decisão do produtor.

3.1.4 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus durante a lactação

As vacas selecionadas para tratamento durante a lactação (n=117) foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos, balanceados de acordo com os dias em lactação e a ordem de parto (Figura 1): a) controle, sem antibioticoterapia e vacinação; b) antibioticoterapia (ATB); c) antibioticoterapia + vacinação (ATB + VAC). A antibioticoterapia foi uma combinação de aplicação intramamária, durante 5 dias, duas aplicações ao dia, de 75 mg de ampicilina e 200 mg de cloxacilina (Bovigam L, Bayer, Irlanda do Norte) associada com injeção intramuscular de enrofloxacina 10% (Kinetomax®, Bayer, Brasil) em dose única (7,5 mg/kg), no primeiro dia da antibioticoterapia. A vacina antimastística (TopVac, HIPRA, Espanha) foi aplicada em 3 doses de 2 ml, via intramuscular, aos 14 dias antes, no primeiro dia e aos 14 dias após o início da antibioticoterapia.

Antes do procedimento de tratamento intramamário, foi feita a desinfecção da extremidade dos tetos com álcool 70% antes da aplicação do antibiótico, e massageamento (dos tetos) após a aplicação.

Figura 1 - Esquema de coletas e tratamentos durante a lactação, de vacas com mastite subclínica causada por *S. aureus*



Fonte: Pinheiro (2016).

3.1.5 Avaliação de cura bacteriológica

As culturas microbiológicas para avaliação de cura foram feitas 14, 21 e 28 dias após o início da terapia com antibiótico intramamário para as vacas selecionadas para o protocolo de tratamento de lactação, e 7, 14 e 21 dias após o parto para as vacas do protocolo de tratamento de secagem.

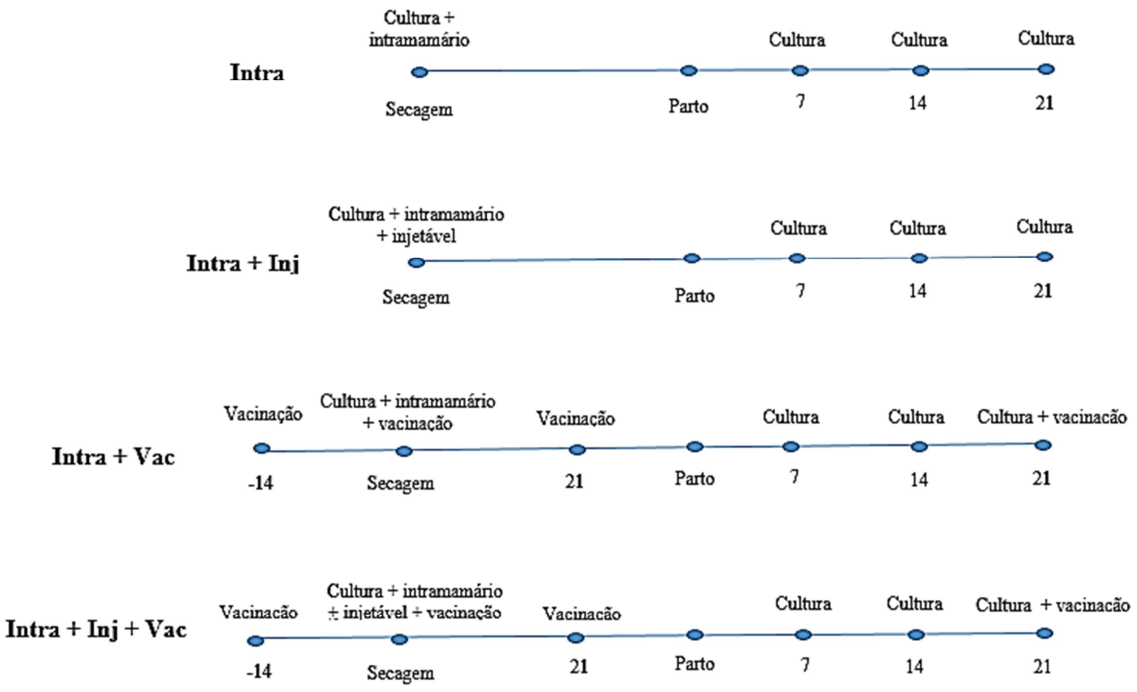
Foram considerados curados os quartos mamários que após os tratamentos apresentaram 3 resultados de culturas negativas para *S. aureus* (sensibilidade de 94% para duas culturas por quarto mamário e 98% para três, segundo SEARS et al., 1990), e como não curados os que apresentaram pelo menos um resultado positivo para *S. aureus* (após a antibioticoterapia) (SOL et al., 1997; DELUYKER et al., 2005). Foi considerada curada a vaca que não apresentou nenhum quarto infectado após 3 resultados de cultura (após a antibioticoterapia), e como não curada a que permaneceu com pelo menos um quarto infectado (após a antibioticoterapia).

3.1.6 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus na secagem

As vacas selecionadas para tratamento na secagem (n=136) foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos, balanceados de acordo com a ordem de parto (Figura

2): a) somente antibiótico intramamário na secagem (AIM), b) antibiótico intramamário + Injetável (INT + INJ); c) antibiótico intramamário + Vacina (INT + VAC); d) antibiótico intramamário + Injetável + Vacina (INT + INJ + VAC). No momento da secagem, após a infusão do tratamento de vaca seca, todas as vacas receberam infusão de selante de teto (MASTBLOCK, Hipra, Espanha) e foram secas abruptamente. O tratamento de vaca seca intramamário foi uma combinação de 250 mg de ampicilina e 500 mg de cloxacilina (Bovigam ®VS, Bayer, Irlanda do Norte). O antibiótico injetável foi enrofloxacina 10% (Kinetomax®, Bayer, Brasil), dose única (7,5 mg/kg), aplicado via intramuscular no dia da secagem. A vacina antimastística (TopVac, HIPRA, Espanha) foi aplicada em 4 doses de 2 ml, via intramuscular, aos 14 dias antes da secagem, no dia da secagem, 21 e 85 dias após a secagem.

Figura - Esquema de coletas e tratamentos durante a secagem, de vacas com mastite subclínica causada por S. aureus



Fonte: Pinheiro (2016).

3.1.7 Análise estatística

A cura bacteriológica (na lactação ou na secagem) foi avaliada considerando-se o quarto mamário e a vaca como a unidade experimental (resposta binomial). Os dados foram

analisados por meio de regressão logística multivariada, usando-se o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.3 (Instituto SAS, Cary, NC), para avaliar o efeito das variáveis independentes (rebanho, número de lactações, classe de dias em lactação, número de quartos mamários infectados por vaca e posição do(s) quarto(s) mamário(s) infectado(s)) sobre a variável dependente (cura bacteriológica). Os modelos mistos lineares generalizados para avaliação do tratamento durante a lactação (modelo 1) e na secagem (modelo 2) foram:

$$(1)\ Y_{ij} = \mu + Trat + Vac + Reb + NL + DEL\ Classe + QI + PQ + error_{ij}$$

$$(2)\ Yij = \mu + Trat + Vac + Reb + NL + QI + PQ + e_{ij}$$

onde Y_{ij} = cura bacteriológica (sim ou não) do quarto mamário ou da vaca; μ = média geral; Trat = efeito fixo de tratamento; Vac = efeito aleatório de vaca; Reb = efeito fixo de rebanho; NL = efeito fixo do número de lactações (1 = primíparas; 2 = pluríparas); DEL Classe = efeito fixo da classe de dias em lactação (1 = 0 a 100 DEL; 2 = 100 a 200 DEL; 3 = > 200 DEL); QI: Quartos Infectados = efeito fixo do número de quartos mamários infectados por vaca (1 = um (1) quarto mamário infectado por *S, aureus*; 2 = dois ou mais quartos mamários infectados por *S, aureus*); PQ: Posição Quarto = efeito fixo da posição do(s) quarto(s) mamário(s) infectado(s) (Anteriores = quarto mamário anterior esquerdo e direito; Posteriores = quarto mamário posterior esquerdo e direito); e_{ij} = erro aleatório associado à cada observação.

A CCS foi avaliada considerando-se o quarto mamário como a unidade experimental. Foi feito uma análise de medidas repetidas no tempo por um modelo misto linear geral, usando-se o PROC MIXED do SAS versão 9.3 (Instituto SAS, Cary, NC) para verificar o efeito das variáveis independentes (rebanho, tratamento, número de lactações, número de quartos mamários infectados por vaca, posição do(s) quarto(s) mamário(s) infectado(s), tempo e a interação tempo x tratamento e da covariável DEL sobre a variável dependente (CCS). Para esta análise a CCS foi transformada em escala logarítmica (Log base 10) e foi especificada uma estrutura associando as medidas repetidas ao longo do tempo (coleta de leite para CCS em diferentes visitas) para os mesmos quartos mamários. O modelo misto linear geral foi:

$$Y_{ij} = \mu + Trat + Vac + Reb + NL + DEL + QI + PQ + Tempo + Tempo\ x\ Trat + e_{ij},$$

onde Y_{ij} = log(10) de CCS do quarto mamário; μ = média geral; Trat = efeito fixo de tratamento (Controle, ATB e ATB + VAC); Vac = efeito aleatório de vaca; Reb = efeito fixo de rebanho; NL = efeito fixo do número de lactações (1 = primíparas; 2 = pluríparas); DEL = efeito da covariável dias em lactação; QI: Quartos Infectados = efeito fixo do número de quartos mamários infectados por vaca (1 = um (1) quarto mamário infectado por *S, aureus*; 2 = dois ou mais quartos mamários infectados por *S, aureus*); PQ: Posição Quarto = efeito fixo da posição do(s) quarto(s) mamário(s) infectado(s) (Anteriores = quarto mamário anterior esquerdo e direito; Posteriores = quarto mamário posterior esquerdo e direito); e_{ij} = erro aleatório associado à cada observação do plot principal e subplot.

A resposta dos isolados ao tratamento (na lactação e na secagem) foi avaliada considerando-se o isolado como a unidade experimental (resposta binomial, cura ou não cura). Os isolados do tratamento controle (do protocolo de tratamento na lactação) foram excluídos desta análise. Os dados foram analisados por meio de regressão logística multivariada, usando-se o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.3 (Instituto SAS, Cary, NC), para avaliar o efeito das variáveis independentes (rebanho, número de lactações, tipo de tratamento, classificação dos isolados em adaptado e não adaptado, resistência aos antibióticos: penicilina, ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, oxacilina, cefalotina, ceftioufur, penicilina + novobiocina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, enrofloxacina e pirlimicina) sobre a variável dependente (cura bacteriológica). O modelo misto linear generalizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + Reb + NL + FaseTrat + Adap + ResPen + ResAmp + ResAmoxClav + ResOxa + ResCefa + ResCeft + ResPenNovo + ResEri + ResGen + ResTetra + ResEnro + ResPir + e_{ij}$$

onde Y_{ij} = cura bacteriológica (sim ou não) do quarto mamário; μ = média geral; Reb = efeito fixo de rebanho; NL = efeito fixo do número de lactações (1 = primíparas; 2 = pluríparas); FaseTrat = efeito fixo do tipo do tratamento (lactação ou secagem); Adap = efeito fixo da classificação dos isolados em adaptados e não adaptados; ResPen = efeito fixo da resistência à penicilina; ResAmp = efeito fixo da resistência à ampicilina; ResAmoxClav = efeito fixo da resistência à amoxicilina + ácido clavulânico; ResOxa = efeito fixo da resistência à oxacilina; ResCefa = efeito fixo da resistência à cefalotina; ResCeft = efeito fixo da resistência à ceftiofur; ResPenNovo = efeito fixo da resistência à penicilina + novobiocina; ResEri = efeito fixo da resistência à eritromicina; ResGen = efeito fixo da resistência à gentamicina; ResPen = efeito fixo da resistência à tetraciclina; ResEnro = efeito fixo da

resistência à enrofloxacina; ResPir = efeito fixo da resistência à pirlimicina; e_{ij} = erro aleatório associado à cada observação.

A multirresistência aos antibióticos (resistência a três ou mais classes de antibióticos) foi avaliada considerando-se o isolado como a unidade experimental (resposta binomial). Os dados foram analisados por meio de regressão logística multivariada, usando-se o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.3 (Instituto SAS, Cary, NC), para avaliar o efeito das variáveis independentes (número de lactações, classificação dos isolados em adaptados e não adaptados e resistência à oxacilina) sobre a variável dependente (cura bacteriológica). O modelo misto linear generalizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + NL + Adap + ResOxa + e_{ij}$$

onde Y_{ij} = multirresistência (sim ou não) do isolado; μ = média geral; NL = efeito fixo do número de lactações (1 = primíparas; 2 = pluríparas); Adap = efeito fixo da classificação dos isolados em adaptados e não adaptados; ResOxa = efeito fixo da resistência à oxacilina; e_{ij} = erro aleatório associado à cada observação.

A resistência de *S. aureus* à penicilina foi avaliada considerando-se o isolado como a unidade experimental (resposta binomial). Os dados foram analisados por meio de regressão logística multivariada, usando-se o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.3 (Instituto SAS, Cary, NC), para avaliar o efeito das variáveis independentes (rebanho, número de lactações, classificação dos isolados em adaptados e não adaptados e fase do tratamento) sobre a variável dependente (resistência à penicilina). O modelo misto linear generalizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + Reb + NL + Adap + FaseTrat + e_{ij}$$

onde Y_{ij} = resistência à penicilina (sim ou não) do isolado; μ = média geral; Reb = efeito fixo de rebanho; NL = efeito fixo do número de lactações (1 = primíparas; 2 = pluríparas); Adap = efeito fixo da classificação dos isolados em adaptados e não adaptados; FaseTrat = efeito fixo da fase do tratamento (lactação ou secagem); e_{ij} = erro aleatório associado à cada observação.

3.1.8 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foram avaliados pelo método de disco difusão, conforme metodologia descrita no VET01-S2 (2013), utilizando-se os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina-Clavulanato, Ampicilina, Cefalotina, Ceftiofur, Enrofloxacina, Eritromicina, Gentamicina, Oxacilina, Penicilina, Penicilina/Novobiocina, Pirlimicina e Tetraciclina.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de um cultivo puro dos isolados, de 24 horas, em caldo BHI. A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril a densidade ótica (600 nm) de 0,9 de modo a obter uma turbidez comparável à da solução padrão 0,5 McFarland (aproximadamente 1 a 2 X 10^8 UFC/mL). A partir desta diluição, o inóculo bacteriano foi semeado em ágar Mueller Hinton II usando suabe estéril. Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos de antimicrobianos foram distribuídos individualmente. As placas foram incubadas em aerobiose por 24h a 37ºC e, então, examinadas quanto à formação de halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos de antimicrobianos.

Foram utilizados os critérios interpretativos disponíveis nos documentos VET01-S2 (CLSI, 2013) e M100-S19 (CLSI, 2009) para avaliação dos resultados obtidos (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios interpretativos aplicados aos resultados do teste de disco difusão em isolados de *S. aureus*

Antimicrobiano	**Classificação de acordo com o halo de inibição (mm)**		
	Sensível	**Intermediário**	**Resistente**
Amoxicilina-Clavulanato	≥20	-	≤19
Ampicilina	≥29	-	≤28
Cefalotina	≥18	15 – 17	≤14
Ceftiofur	≥21	18 – 20	≤17
Enrofloxacina	≥21	17 – 20	≤16
Eritromicina	≥23	14 – 22	≤13
Gentamicina	≥15	13 – 14	≤12
Oxacilina	≥13	11 – 12	≤10
Penicilina	≥29	-	≤28
Penicilina/Novobiocina	≥18	15 – 17	≤14
Pirlimicina	≥13	-	≤12
Tetraciclina	≥19	15 – 18	≤14

Fonte: Pinheiro, 2016.

3.1.9 Extração de DNA

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos à extração de DNA segundo o protocolo descrito por Boom et al. (1990), com tratamento enzimático prévio com lisozima (100 mg) e proteinase K (20mg) (US Biological) a 37°C por 60 minutos.

3.1.10 Identificação de S. aureus por PCR convencional

A identificação de *S. aureus* foi realizada pela pesquisa do gene *murD* por PCR, segundo o protocolo de Pechorsky et al. (2009). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado, 2,5 mM de $MgCI_2$, 20 pmoles de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H_20 MiliQ® até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1

minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C. A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.1.11 Pesquisa do gene mecA

Para os isolados que apresentaram resistência a oxacilina foi realizada a pesquisa do gene *mecA* por PCR segundo o protocolo de Kearns et al. (1999). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado, 2,5 mM de $MgCl_2$, 20 pmoles de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H_20 MiliQ® até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 50°C e 40 segundos a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C. A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.1.12 Identificação de S. aureus por espectrometria de massa MALDI-TOF

Uma alíquota de cultivo bacteriano em caldo BHI foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete recebeu 300 µl de água ultrapura e 900 µl de etanol. Em seguida, essa solução foi agitada e os tubos foram centrifugados a 13.000xg por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram secos em temperatura ambiente. Aos sedimentos, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico (70%), e 50 µl de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000xg por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido à um microtubo novo e armazenado a -20°C.

Foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) para captura dos espectros proteicos. Para tanto, 1 uL da suspensão proteica foi transferido para a

placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 uL da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). A captura dos espectros proteicos foi feita pelo programa FlexControl™ (Bruker Daltonik), método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado pela utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli (*BTS - Bruker Daltonik*).*

A identificação bacteriana foi feita pelo espectro proteico e foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik), que realizou uma comparação dos espectros capturados para cada cepa com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, foi obtido um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios de interpretação do escore do fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0, aceitos para atribuição de espécie, escores ≥ 1.7 e < 2.0, utilizados para identificação de gênero.

3.2 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hin*d III. A técnica consistiu em três etapas:

a) Restrição do DNA bacteriano pela enzima Hind III.

Em um microtubo contendo 10 µL do DNA bacteriano extraído foram adicionados 24 U *Hind* lIl, 2 µL tampão da enzima *Hind* IIl e 5,6 µL de H_20 MilliQ®, perfazendo um volume total de 20 µL. Essa amostra foi incubada a 37°C por 12 horas. A posição reativa ao sítio de restrição da enzima *Hind* III está apresentada no Quadro 5.

b) Ligação de adaptadores de ao DNA digerido.

Em um novo microtubo foram adicionados 5 µL do DNA digerido, 4 µL tampão de T4 DNA-ligase, 0,2 µL de cada adaptador (ADH1 / ADH2), 1 U T4 DNA ligase e H_20 MiliQ® para o volume final de 15 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período, o DNA ligado aos adaptadores foi aquecido a 80°C por 10 minutos para inativação da enzima T4 DNA ligase. As sequências dos adaptadores ADH1 e ADH2 estão descritas no Quadro 5.

c) Amplificação seletiva dos fragmentos de restrição

Os fragmentos de restrição foram submetidos a uma amplificação utilizando o iniciador HI-G (Quadro 5). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado, 2,5 mM de $MgCI_2$, 300 ng do iniciador (HI-G), 1 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H_20 MiliQ® até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C .

Quadro 5 - Sítio de restrição da enzima Hind III e sequências de nucleotídeos dos adaptadores ADH1 e ADH2 e do iniciador HI-G

[1]Sítio de restrição *Hind* III	5´ AGCTT----//----A 3´ 3´ A----//----TTCGA 5´
[2]Adaptadores	ADH 1 5´ ACGGTATGCGACAG 3´ ADH 2 3´ GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5´
[3]Iniciador	HI-G 5’ GGTATGCGACAGAGCTTG 3’

Fonte: Pinheiro (2016).

[1]Sítios de restrição da endonuclease *Hin*d III; [2]sequência dos oligonucleotídeos complementares que foram os adaptadores que se ligaram às extremidades dos fragmentos de restrição; [3]sequência do iniciador utilizado na amplificação dos fragmentos de restrição.

3.2.1 Visualização dos produtos amplificados

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 30 V durante 26 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.2.2 Análise de agrupamento dos fragmentos amplificados

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados foi utilizado o programa Bionumerics 7.5 (Applied Maths). Um dendrograma foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90% de similaridade genética foi utilizado para determinação e análise dos agrupamentos obtidos (VAN BELKUM et al., 2007).

3.2.3 Determinação do Índice Discriminatório (DI)

Os resultados da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), sendo possível calcular o Índice Discriminatório (DI) a partir da seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} nj(nj-1)$$

onde N é o número de amostra da população teste, *s* é o número de diferentes tipos e *nj* é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos.

3.3 RESULTADOS

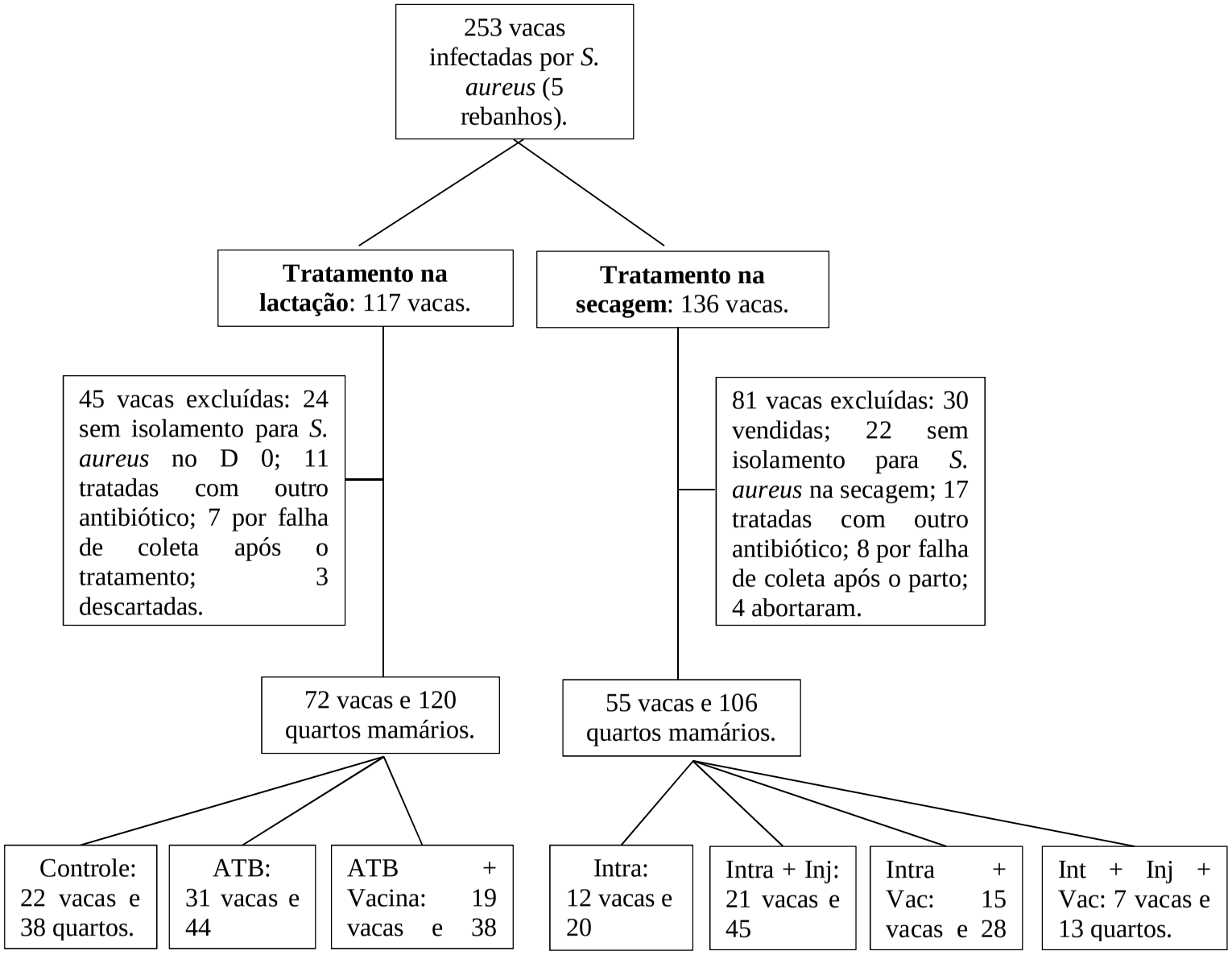
Um total de 253 vacas de 5 rebanhos apresentaram isolamento positivo de *S. aureus* a partir de amostras compostas de leite de todos os quartos mamários (fase de seleção das vacas). Do total de vacas com isolamento positivo de *S. aureus*, 117 foram selecionadas para receberem o tratamento durante a lactação, e 136 para o tratamento na secagem.

Das 117 vacas selecionadas para receberem o tratamento durante a lactação, foram excluídas: a) 24 vacas que não apresentaram nenhum quarto com isolamento de *S. aureus* no

dia em que o tratamento foi iniciado (d 0), b) 11 vacas tratadas com outro antibiótico, contra infecções de casco, c) 7 vacas com falha de coleta dos quartos e/ou contaminação em mais de uma amostra após o tratamento, d) 3 vacas descartadas pelo proprietário. Após a exclusão de 45 vacas, 120 quartos mamários de 72 vacas foram incluídas nas análises estatísticas (Figura 3)

Das 136 vacas selecionadas para o tratamento na secagem, foram excluídas: a) 33 vacas descartadas pelo proprietário, b) 21 vacas que não apresentaram nenhum quarto com isolamento positivo para *S. aureus* no dia da secagem, c) 18 vacas tratadas contra metrite e retenção de placenta após o parto, d) 8 vacas com falha de coleta dos quartos e/ou contaminação em mais de uma amostra após o tratamento, e) 4 vacas que abortaram. Após a exclusão de 84 vacas, 101 quartos mamários de 52 vacas foram incluídas nas análises estatísticas (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição de vacas e quartos mamários selecionados para tratamento de mastite causada por S. aureus na lactação e secagem



Fonte: Pinheiro (2016)

3.3.1 Tratamento de mastite subclínica causada por S. aureus durante a lactação

No tratamento durante a lactação, a maior frequência de quartos mamários tratados foi de vacas com: a) 2 e 4 ou mais partos, representando 31,7 e 30% do total de quartos, respectivamente, b) mais de 200 DEL, representado 60,8% do total de quartos. Vacas com apenas um quarto infectado foram as mais frequente (52,8% do total de vacas), e em média cada vaca tratada na lactação apresentou 1,7 quartos infectados por *S. aureus* (Tabela 2).

Tabela 2 - Estatística descritiva do total de quartos mamários e vacas com infecção intramamária causada por S. aureus e tratados durante a lactação

(continua)

Item	Tratamentos[1]			Total
	Controle	ATB	ATB + VAC	
Vacas	22 (16,7%)	31 (31,9%)	19 (16,7%)	72 (100%)
NL[2]				
1	4	5	4	13 (18,1%)
2	9	11	5	25 (34,7%)
3	4	3	6	13 (18,1%)
≥4	5	12	4	21 (29,2%)
DEL Classe[3]				
1	3	5	3	9 (12,5%)
2	7	8	7	22 (30,6)%)
3	12	18	9	41 (56,9%)
Número de Quartos[4]				
1	13	20	5	38 (52,8%)
2	4	8	9	21 (29,2%)
3	4	3	5	12 (16,7%)
4	1	-	-	1 (1,4%)
Quartos mamários	38 (31,7%)	44 (36,7%)	38 (31,7%)	120 (100%)
NL				
1	5	8	8	21 (17,5%)
2	15	15	8	38 (31,7%)
3	10	3	12	25 (20,8%)
≥4	8	18	10	36 (30,0%)

(conclusão)

Item	Tratamentos[1]			Total
	Controle	ATB	ATB + VAC	
DEL Classe				
1	4	6	1	11 (9,2%)
2	12	11	13	36 (30,0%)
3	22	27	24	73 (60,8%)
Posição Quarto[5]				
Posteriores	20	23	20	63 (52,5%)
Anteriores	18	21	18	57 (47,5%)

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação), [2]NL: número de.lactações; [3]DEL: dias em lactação, Classe: 1 a 100 dias em lactação (DEL); 2, >100 a 200 DEL; 3, >200 DEL,[4]Número de quarto mamário infectado por *S, aureus*;. [5]Posição do Quarto infectado.

3.3.2 Cura bacteriológica

A taxa de cura bacteriológica não ajustada dos quartos tratados na lactação foi de 2,6% para os quartos do tratamento Controle, 77,3% para os quartos do tratamento ATB e 84,2% para os quartos do tratamento ATB + VAC (tabela 3). A taxa de cura bacteriológica, após ser ajustada para os demais efeitos do modelo estatístico, está apresentada na Tabela 4.

Tabela 3 - Estatística descritiva das taxas de cura de tratamento de S. aureus durante a lactação, de acordo com o número de lactações, estágio da lactação, número de quartos infectados e posição dos quartos infectados (72 vacas e 120 quartos mamários)

(continua)

Item	Vaca		Quarto	
	Total	Cura N (%)	Total	Cura N (%)
Tratamento[1]				
Controle	22	1 (4,5%)[a]	38	1 (2,6%)[a]
ATB	31	23 (74,2%)[b]	44	34 (77,3%)[b]
ATB + VAC	19	14 (73,7%)[b]	38	32 (84,2%)[b]
NL[2]				
1	13	9 (69,2%)[a]	21	16 (78,2%)[c]
2	25	11 (44,0%)[b]	38	16 (42,1%)[d]
3	13	7 (53,8%)[b]	25	13 (52,0%)[d]
≥4	21	11 (52,4%)[b]	36	22 (61,1%)[d]

(conclusão)

Item	Vaca		Quarto	
	Total	Cura N (%)	Total	Cura N (%)
DEL Classe[3]				
1	9	5 (55,6%)	11	5 (45,5%)
2	22	10 (45,5%)	36	18 (50,0%)
3	41	23 (56,1%)	73	44 (60,3%)
Número de quartos[4]				
1	38	23 (60,5%)	38	23 (60,5%)
2	21	9 (42,9%)	42	22 (52,4%)
3	12	6 (50,0%)	36	22 (61,1%)
4	1	0 (0%)	4	0 (0%)
Posição Quarto[5]				
Posteriores			63	35 (55,6%)
Anteriores			57	32 (56,1%)

Fonte: Pinheiro (2016).
[a,b]Resultados com letra sobrescrita são diferentes ($P < 0,05$).
[1]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação), [2]NL: número de lactações; [3]DEL: dias em lactação, Classe: 1 a 100 dias em lactação (DEL); 2, >100 a 200 DEL; 3, >200 DEL,[4]Número de quarto mamário infectado por *S, aureus*;. [5]Posição do Quarto infectado.

Quartos mamários tratados com ATB e ATB + VAC apresentaram maior taxa de cura (77,3 e 84,2 vs. 2,6%; P = 0,0018) do que quartos mamários não tratados (controle). Porém, não houve diferença na taxa de cura entre os quartos que foram tratados com antibioticoterapia e com antibioticoterapia + vacinação (P = 0.932), o que indica que não houve melhora na eficiência do tratamento com antibioticoterapia quando a vacina foi utilizada (Tabela 4).

Houve uma tendência (P = 0,055) de maior taxa de cura bacteriológica dos quartos mamários das primíparas (93%) do que os quartos das pluríparas (28,9%). Não houve efeito de rebanho, classe de dias em lactação, número de quartos mamários infectados por vaca e posição do quarto mamário infectado sobre a taxa de cura bacteriológica dos quartos mamários (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados do modelo misto de regressão logística referentes à taxa de cura bacteriológica ajustada de quartos mamários infectados por S. aureus e submetidos ao tratamento durante a lactação

Efeito	Coeficiente	Erro Padrão	Taxa de cura (%)[1]	IC 95%		*P*	Razão de chance
Cura bacteriológica							
Intercepto	0,80	2,03		-3,27	4,87	0,696	
Tratamento[2]						0,0018	
Controle	Referência		4,3				
ATB	5,99	1,74	94,7	2,49	9,48	0,0012	397,87
ATB + VAC	5,89	1,59	94,1	2,68	9,10	0,0006	360,74
NL[3]						0,0552	
1	Referência		93				
≥2	-3,49	1,77	28,9	-7,06	0,08	0,0552	0,03
DEL Classe[4]						0,5492	
1	Referência		85,4				
2	-1,10	1,19	66,1	-3,48	1,30	0,76	0,57
3	-1,66	1,86	52,6	-5,40	2,08	0,38	0,19
Número de quartos [5]						0,16	
1	Referência		84,4				
≥2	-1,68	1,18	50	-4,06	0,69	0,16	0,18
Posição Quarto[6]						0,437	
Posteriores	Referência		63,1				
Anteriores	0,62	0,79	76,1	-0,97	2,22	0,437	1,86

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Taxa de cura: % ajustado de quartos curados baseado no modelo misto de regressão logística.
[2]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação), A antibioticoterapia foi uma combinação de aplicação de 75 mg de ampicilina e 200 mg de cloxacilina (Bovigam L - Bayer Irlanda do Norte), via intramamária por 5 dias, com uma dose de enrofloxacina 10% (Kinetomax®, Bayer S, A,, São Paulo Brasil), via intramuscular, aplicada no primeiro dia da ATB, A vacina antimastística (TopVac, HIPRA, Espanha) foi aplicada via intramuscular 14 dias antes da ATB, no primeiro da ATB e 14 dias após a aplicação da segunda dose (total de 3 doses),
[3]NL: número de lactações; [4] Classe de DEL (dias em lactação) ,1: 1 a 100 ; 2: >100 a 200; 3: >200; [5]Número de quartos infectados por *S, aureus;* [6]Posição do quarto infectado por *S, aureus.*

Quando a análise foi feita com a vaca como a unidade experimental, primíparas tiveram maior taxa de cura bacteriológica do que pluríparas (P = 0,02), e vacas com apenas um quarto infectado tiveram maior taxa de cura do que vacas com dois ou mais quartos infectados (P = 0,04).

Tabela 5 - Resultados do modelo misto de regressão logística referentes à cura bacteriológica de vacas infectadas por S. aureus e submetidas ao tratamento durante a lactação

Efeito	Coeficiente	Erro Padrão	Taxa de cura (%)[1]	IC 95%		*P*	Razão de chance
Cura bacteriológica							
Intercepto	-1,63	2,25	-	-6,13	2,882	0,4735	-
Tratamento[2]	-	-	-	-	-	0,0051	-
Controle	Referência	-	1,1	-	-	-	-
ATB	6,69	2,03	89,7	2,62	10,75	0,0017	803,0
ATB + VAC	5,77	1,81	77,6	2,15	9,39	0,0023	320,7
NL[3]	-	-	-	-	-	-	-
1	Referência	-	78,9	-	-	-	-
≥2	-3,39	1,428	11,2	-6,24	-0,53	0,0208	0,034
DEL Classe[4]	-	-	-	-	-	0,2855	-
1	Referência	-	27,1	-	-	-	-
2	-0,04	1,58	26,4	-3,19	3,12	0,9816	0,964
3	1,87	1,73	70,8	-1,59	5,34	0,2836	6,509
Número de quartos[5]	-	-	-	-	-	0,0417	-
1	Referência	-	69,8	-	-	-	-
≥2	-2,43	1,17	16,9	-4,76	-0,1	0,0417	0,088

Fonte: Pinheiro (2016).

[1]Taxa de cura: % ajustado de vacas curadas baseado no modelo misto de regressão logística.

[2]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação), A antibioticoterapia foi uma combinação de aplicação de 75 mg de ampicilina e 200 mg de cloxacilina (Bovigam L - Bayer Irlanda do Norte), via intramamária por 5 dias, com uma dose de enrofloxacina 10% (Kinetomax®, Bayer S, A,, São Paulo Brasil), via intramuscular, aplicada no primeiro dia da ATB, A vacina antimastística (TopVac, HIPRA, Espanha) foi aplicada via intramuscular 14 dias antes da ATB, no primeiro da ATB e 14 dias após a aplicação da segunda dose (total de 3 doses);

[3]NL: número de lactações; [4] Classe de DEL (dias em lactação) ,1: 1 a 100 ; 2: >100 a 200; 3: >200; [5]Número de quartos infectados por *S, aureus;* [6]Posição do quarto infectado por *S, aureus.*

3.3.3 Contagem de células somáticas

A CCS foi analisada em 85 quartos mamários (de 3 rebanhos), sendo que as amostras de leite de 35 quartos restantes (de outros 2 rebanhos) não foram coletadas para análise de CCS. As médias aritiméticas não ajustadas de CCS no primeiro dia da antibioticoterapia foram: 1.175, 744 e 678 x 10^6 cél/mL, nos grupos Controle, ATB e ATB + VAC, respectivamente. Após 28 dias do início da antibioticoterapia, as médias não ajustadas de

CCS foram :1.089, 590 e 266 x 10^6 cél/mL, nos grupos Controle, ATB e ATB + VAC, respectivamente.

Houve interação entre o tempo e os tratamentos (*P* = 0,04). No primeiro dia da antibioticoterapia não houve diferença entre a CCS dos 3 tratamentos, porém, após 28 dias, a CCS dos quartos mamários do tratamento ATB + VAC foi menor do que a CCS dos quartos do tratamento Controle (Tabela 6).

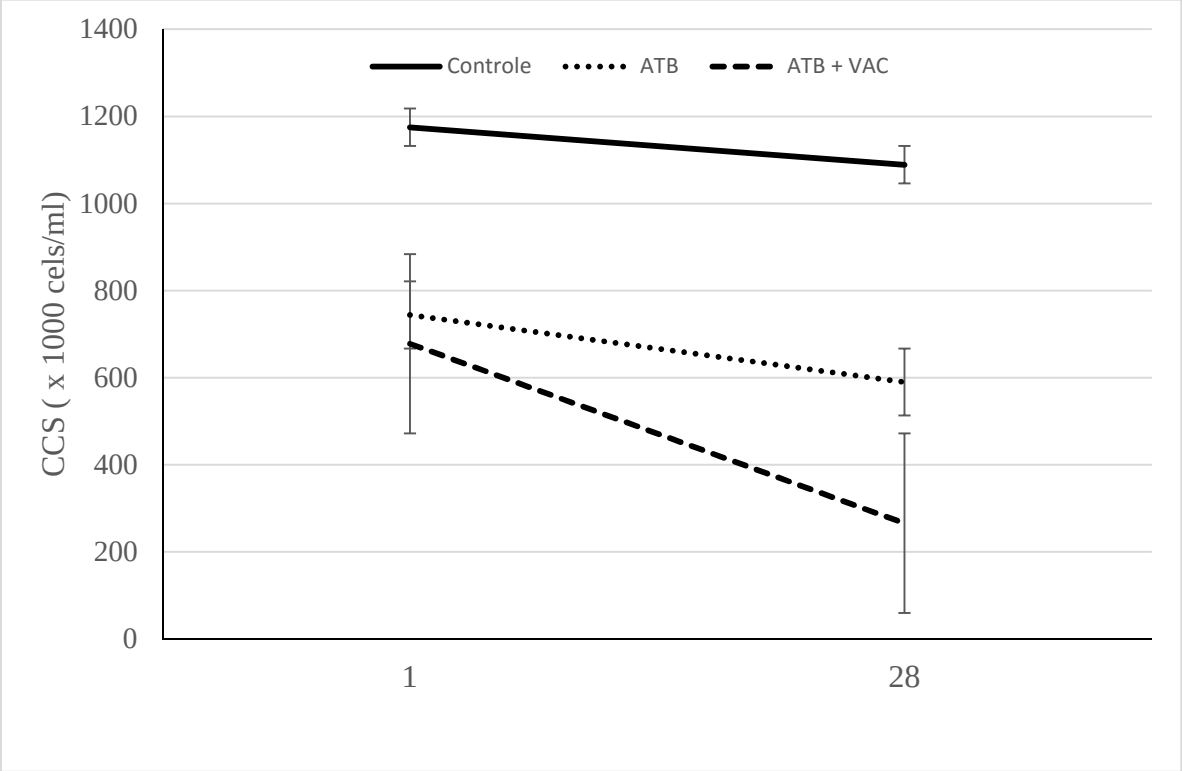
A CCS de quartos mamários de primíparas foi menor do que a CCS de quartos de pluríparas (*P* = 0,034). Porém, não houve efeito de interação entre o tempo e o número de lactações sobre a CCS. Portanto, a CCS de quartos de primíparas foi menor do que a CCS de quartos de pluríparas em ambos os tempos de coleta (antes e depois do tratamento).

Tabela 6 - Modelo misto linear geral com mediadas repetidas no tempo da CCS de 85 quartos mamários antes e depois do protocolo de tratamento na lactação

Tempo de coleta	Tratamentos			EP	*P*		
	Controle	ATB	ATB+VAC		Trat	Tempo	Trat x Tempo
1º dia[1]	5,76[a]	5,46[a]	5,61[a]	0.059	0.17	<.0001	0.04
28ºdia[2]	5,37[a]	5,03[ab]	4,76[b]	0.097			

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]CCS1: log (10) da CCS dos quartos mamários no primeiro dia da antibioticoterapia. [2]CCS2: log (10) da CCS dos quartos mamários 28 dias após o início da antibioticoterapia.
Resultados com letra sobrescrita diferente na mesma linha foram estatisticamente significativos (*P* < 0,05).

Figura 4 - Valores médios de CCS (n=85 quartos mamários) antes e as 28 dias após tratamento na lactação



Fonte: Pinheiro (2016).

3.4 TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR S. AUREUS NA SECAGEM

A maior frequência de quartos mamários tratados na secagem foi de vacas com 2 partos, representando 40,6% do total de quartos. Vacas com apenas um quarto infectado foram as mais frequente (43,6% do total de vacas), e em média cada vaca tratada na secagem apresentou 1,9 quartos infectados (Tabela 7).

Tabela 7 - Estatística descritiva do total de quartos mamários e vacas com infecção intramamária causada por S. aureus e tratados na secagem

Item	Tratamentos				Total
	Intra	Intra + Inj	Intra + Vac	Intra + Inj + Vac	
Vacas	12 (21,8%)	21 (38,2%)	15 (27,3%)	7 (12,7%)	55 (100%)
NL[1]					
1	1	4	5	3	13 (23,6%)
2	3	9	6	2	20 (36,4%)
3	3	4	2	1	10 (18,2%)
≥4	5	4	2	1	12 (21,8%)
Número de Quartos[2]					
1	7	7	7	3	24 (43,6%)
2	3	6	4	3	16 (29,1%)
3	1	6	3	-	10 (18,2%)
4	1	2	1	1	5 (9,1%)
Quartos mamários	20 (18,9%)	45 (42,5%)	28 (26,4%)	13 (12,3%)	106 (100%)
NL					
1	2	8	8	5	23 (21,7%)
2	5	21	14	3	43 (40,6%)
3	4	7	3	4	18 (17%)
≥4	9	9	3	1	22 (20,8%)
Posição Quarto[3]					
Posteriores	10	25	17	6	58 (54,7%)
Anteriores	10	20	11	7	48 (45,3%)

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação), [2]NL: número de lactações; [3]DEL: dias em lactação, Classe: 1 a 100 dias em lactação (DEL); 2, >100 a 200 DEL; 3, >200 DEL,[4]Número de quarto mamário infectado por *S, aureus*;. [5]Posição do Quarto infectado.

3.4.1 Cura bacteriológica

A taxa de cura bacteriológica não ajustada dos quartos tratados na secagem foi de 100, 88,9, 85,7 e 100% para os quartos dos tratamentos Intra, Intra + Inj, Intra + Vac e Intra + Inj + Vac, respectivamente (tabela 8).

Tabela 8 - Estatística descritiva das taxas de cura de tratamento de S. aureus na secagem, de acordo com o número de lactações, número de quartos infectados e posição dos quartos infectados (55 vacas e 106 quartos mamários)

Item	Vaca		Quarto	
	Total	Cura N (%)	Total	Cura N (%)
Tratamento[1]				
Intra	12	12 (100%)	20	20 (100%)
Intra + Inj	21	17 (81,0%)	45	40 (88,9%)
Intra + Vac	15	12 (80,0%)	28	24 (85,7%)
Intra + Inj + Vac	7	7 (100%)	13	13 (100%)
NL[2]				
1	13	13 (100%)	23	23 (100%)
2	20	16 (80%)	43	37 (86%)
3	10	10 (100%)	18	18 (100%)
≥4	12	10 (83,3%)	22	19 (86,4%)
Número de quartos[4]				
1	24	24 (100%)	24	24 (100%)
2	16	14 (87,5%)	32	29 (90,6%)
3	10	8 (80%)	30	27 (90%)
4	5	3 (60%)	20	17 (85%)
Posição Quarto[5]				
Posteriores			58	54 (93,1%)
Anteriores			48	43 (89,6%)

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Tratamento: Controle, sem antibioticoterapia e vacinação; ATB (antibioticoterapia); ATB + VAC (antibioticoterapia + vacinação)'), [2]NL: número de lactações; [3]DEL: dias em lactação, Classe: 1 a 100 dias em lactação (DEL); 2, >100 a 200 DEL; 3, >200 DEL,[4]Número de quarto mamário infectado por *S, aureus*;. [5]Posição do Quarto infectado.

As taxas de cura bacteriológica, após serem ajustados os demais efeitos do modelo estatístico, estão apresentadas na Tabela 9. Quartos mamários tratados com Intra, Intra + Inj, Intra + Vac e Intra + Inj + Vac apresentaram taxa de cura de 100, 81, 80 e 100%, respectivamente. Não houve diferença na taxa de cura entre os quartos tratados (P = 1,00), o que indica que houve uma alta eficiência do tratamento com ampicilina + cloxacilina na secagem. (Tabela 9). Não houve efeito de número de lactações, do rebanho, número de quartos mamários infectados por *S, aureus* por vaca e posição do quarto mamário(s) infectado sobre a taxa de cura bacteriológica dos quartos mamários (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados do modelo misto de regressão logística referentes à cura bacteriológica de quartos mamários infectados por S. aureus e submetidos ao tratamento na secagem

Efeito	Coeficiente	Erro Padrão	Taxa de cura (%)[1]	IC 95%		*P*	Razão de chance
Cura bacteriológica							
Intercepto	2,29	1,14		0,02	4,56	0,048	
Tratamento[2]						1,00	
Intra + Inj + Vac	13,57	973,66	1,00	-1919	1946	0,98	>999,9
Intra + Inj	14,61	769,32	1,00	-1512	1542	0,98	>999,9
Intra	14,94	777,75	1,00	-1529	1559	0,98	>999,9
Intra + Vac	Referência		0,99				
NL[3]						0,98	
1	13,81	655,40		-1287	1315	0,98	>999,9
≥2	Referência						
Número de quartos [4]						0,98	
1	13,87	667,21		-1311	1338	0,98	>999,9
≥2	Referência						
Posição Quarto[5]						0,58	
Anteriores	-0,44	0,798		-2,03	1,14	0,58	>999,9
Posteriores	Referência						

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Taxa de cura: % ajustado de quartos curados baseado no modelo misto de regressão logística. [2]Tratamento: Intramamário (Intra), vacas secas com antibiótico intramamário (AIM)); Intramamário + Injetável (INT + INJ), vacas secas com AIM e antibiótico injetável (AI); Intramamário + Vacina (INT + VAC) vacas secas com AIM e vacina; Intramamário + Injetável + Vacina (INT + INJ + VAC), vacas secas com AIM, o AI e vacina. [3]NL: número de lactações; [4]DEL: dias em lactação, Classe: 1 a 100 dias em lactação (DEL); 2, >100 a 200 DEL; 3, >200 DEL,[5]Número de quarto mamário infectado por *S, aureus*;. [5]Posição do Quarto infectado.

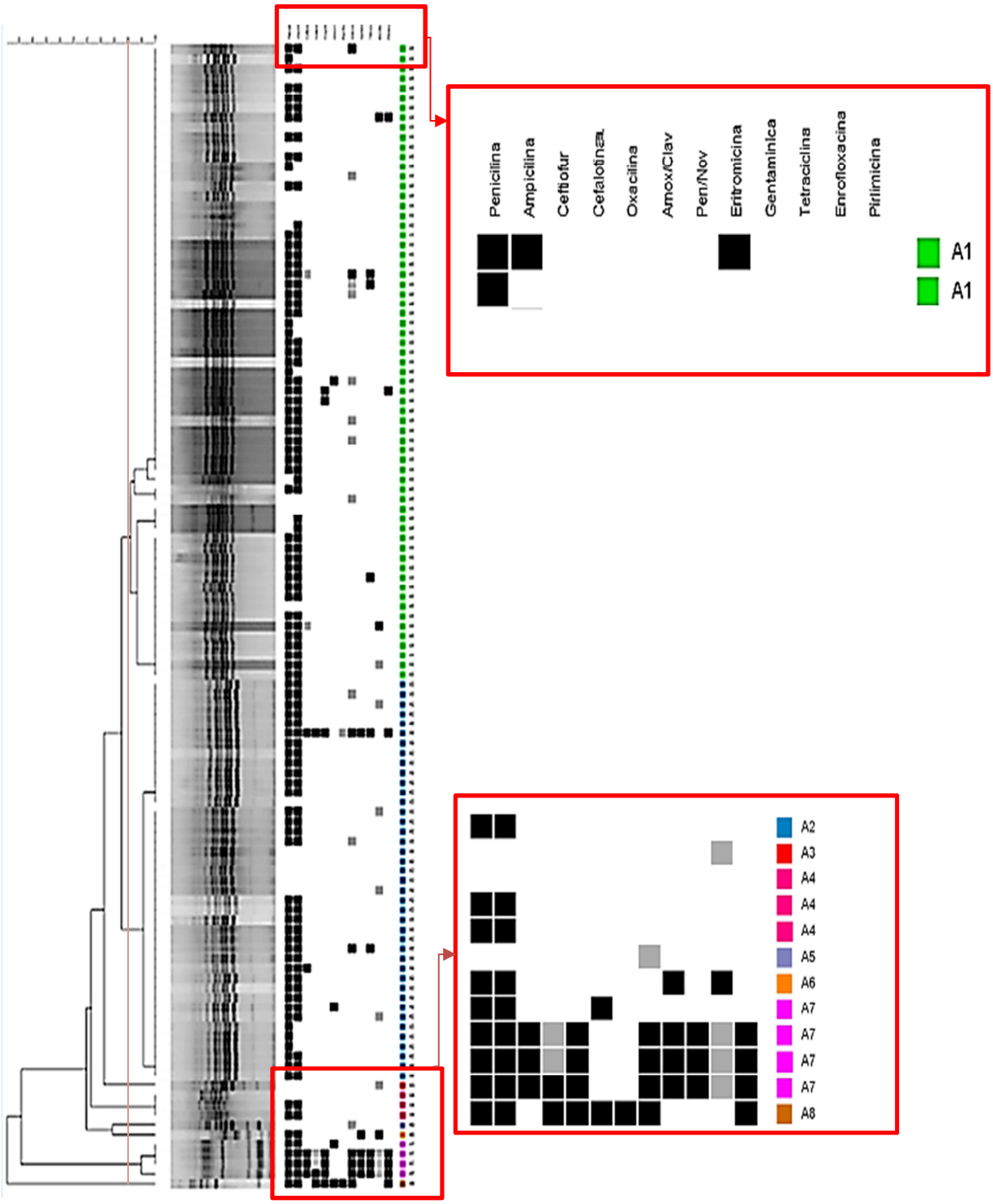
3.5 ANTIBIOGRAMA E AFLP

Cento e dezenove isolados, de 5 rebanhos diferentes, foram selecionados para as análises de antibiograma e AFLP. Destes, 97 isolados foram tratados na lactação e 22 tratados na secagem. Os demais isolados não foram conservados em BHI para posteriores análises.

Antes da realização das análises de antibiograma e AFLP, esses isolados foram submetidos aos exames de PCR convencional e MALDI-TOFI, para confirmação da identificação como *S. aureus*. Dois isolados (1 do tratamento na lactação e 1 do tratamento na secagem) não foram confirmados como *S. aureus*, portanto 117 isolados confirmados pelos exames de PCR convencional e MALD-TOFI foram analisados no antibiograma e AFLP.

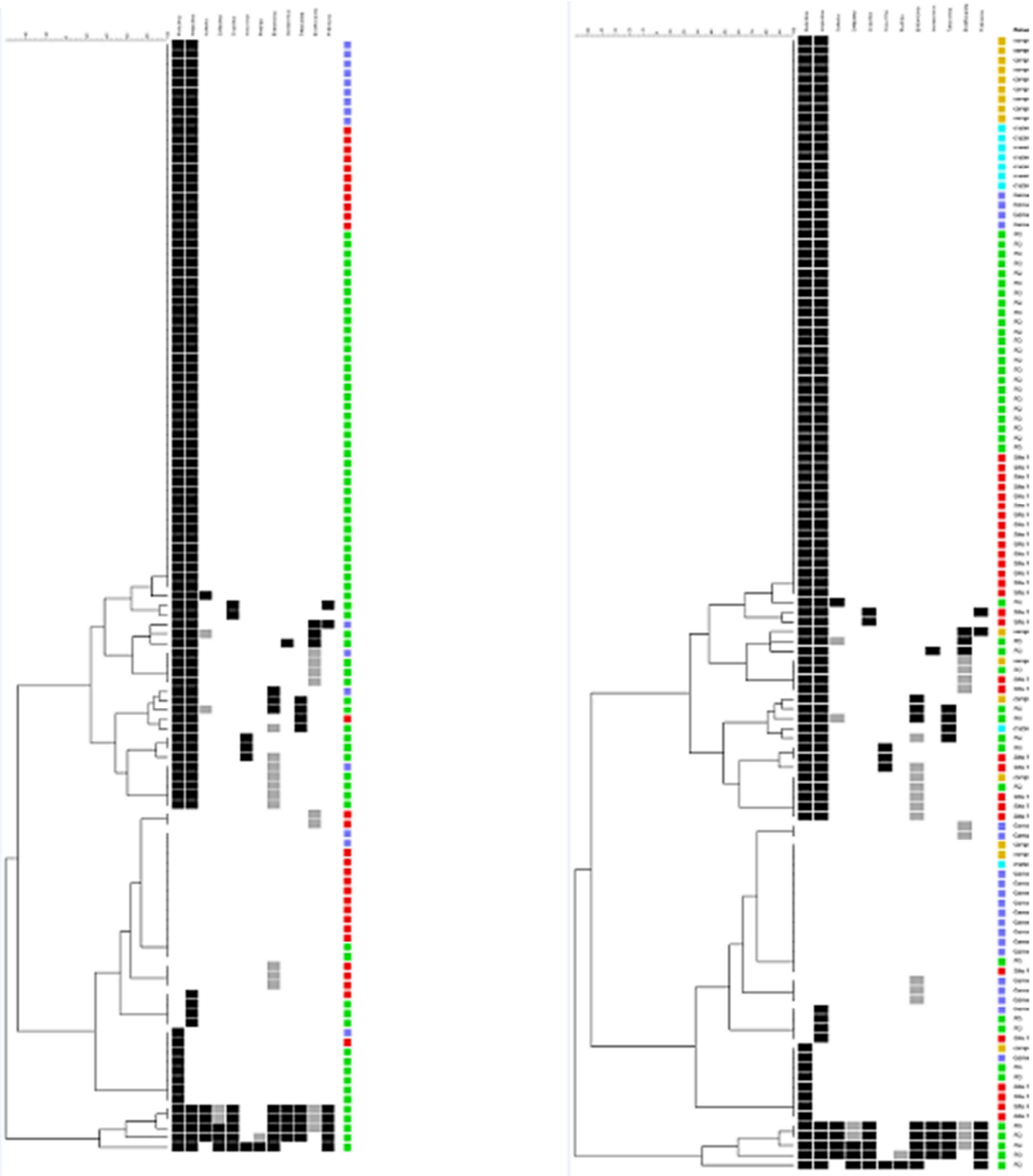
Com base nos resultados de variabilidae genética dos isolados, pela técnica de AFLP, foi feito um dendograma e os isolados foram agrupados em 8 grupos (A1 a A8, sendo que os isolados de um mesmo grupo apresentaram mais de 90% de similaridade genética entre si. O resultado do agrupamento dos isolados pelo AFLP foi comparado ao resultado do antibiograma (Figura 5). O resultado do agrupamento dos isolados pelo antibiograma foi comparado à região geográfica (Figura 6), rebanho (Figura 6) e resposta a antibioticoterapia (Figura 7) do isolado.

Figura 5 - Dendograma dos isolados após o agrupamento pelo AFLP (cada cor representa um grupo de isolados), comparado ao resultado do antibiograma (preto, resistente; cinza, intermediário; e branco, sensível)



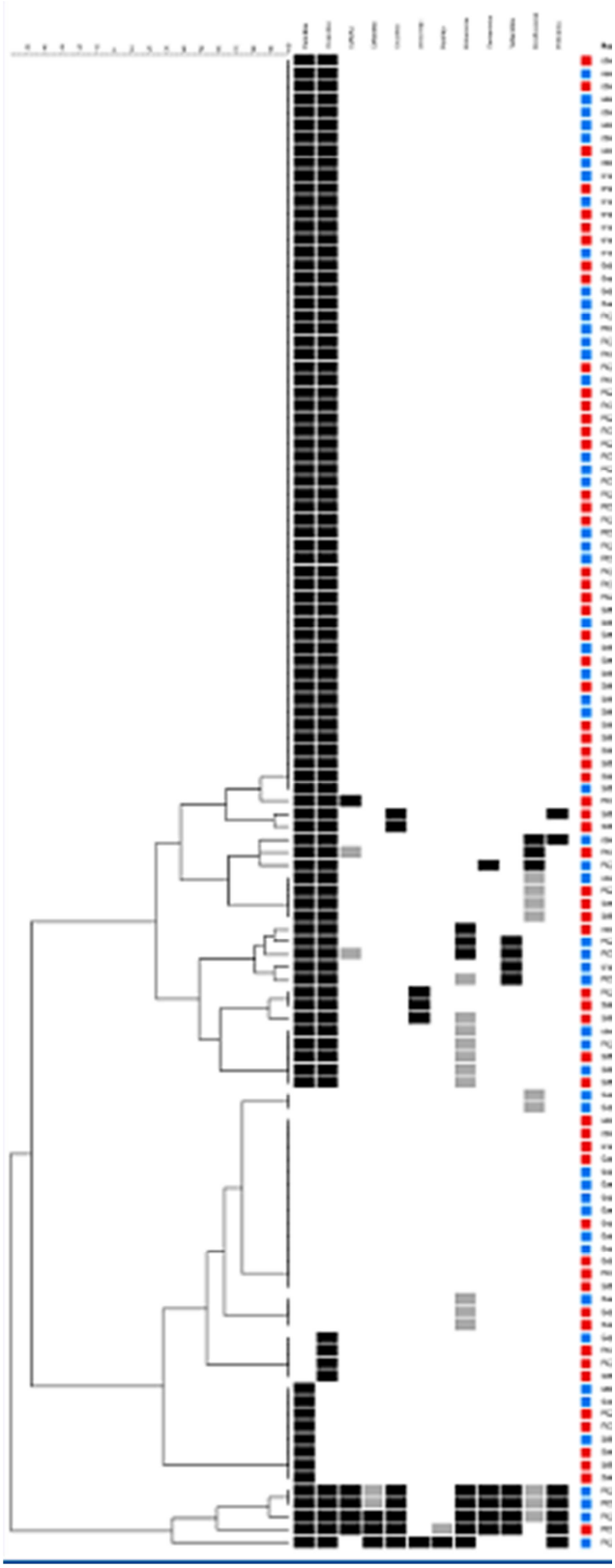
Fonte: Pinheiro (2016).

Figura 6 - Dendograma dos isolados após o agrupamento pelo antibiograma, comparado à região geográfica (a esquerda) e rebanho (a direita) que os isolados pertenciam. Cores diferentes significam regiões geográficas (azul escuro, centro oeste de Minas Gerais; vermelho, noroeste de Minas Gerais; verde, Vale do Paraíba, SP) e rebanhos (amarelo, rebanho 1; azul claro, rebanho 2; azul escuro, rebanho 3; verde, rebanho 4; vermelho, rebanho 5) diferentes



Fonte: Pinheiro (2016).

Figura 7 - Dendograma dos isolados após o agrupamento pelo antibiograma, comparado à resposta a antibioticoterapia (azul, isolados de quartos considerados curados; vermelho, isolados de quartos considerados não curados)



Fonte: Pinheiro (2016).

Os isolados mais frequentes, em todos os rebanhos, foram os dos grupos A1 e A2, representando 55,6% (65/117) e 35% (41/117) do total de isolados, respectivamente. Sendo assim, os grupos A1 e A2 juntos representaram 90,6% do total de isolados, portanto foi sugerido que esses isolados eram adaptados à glândula mamária. Os isolados dos grupos A3 a A8 representaram apenas 9,4% (11/117) do total de isolados, e foram considerados como não adaptados à glândula mamária. Dos isolados adaptados à glândula mamária, 3,8% (4/106) foram multirresistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos), enquanto que 45,5% (5/11) dos isolados não adaptados foram multirresistentes.

Um total de 9 isolados (7,7% do total de isolados) foram multirresistentes, e 88,9% (8/9) destes form isolados do mesmo rebanho (rebanho 4). Todos os isolados multirresistentes que receberam a antibioticoterapia (8/9) não foram recuperados nas amostras pós tratamento (curaram). O único isolado que não recebeu antibioticoterapia (do grupo controle), foi recuperado nas coletas pós tratamento (não curou). Todos os isolados multirresistentes foram resistentes à penicilina e ampicilina (9/9), e 88,9% (8/9) destes isolados foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico.

Quatorze isolados foram sensíveis a todos os antibióticos. Destes, 64,3% (9/14) foram isolados de vacas pertencentes ao rebanho 3, e 60% dos isolados que receberam antibioticoterapia (6/10) não foram recuperados nas amostras pós tratamento.

Houve efeito da classificação dos isolados em adaptados e não adaptados (P = 0,03) e da resistência à oxacilina (P = 0.002) sobre a probabilidade de multirresistência dos isolados. A média ajustada de isolados adaptados e não adaptados que foram multirresistentes foi de 16 e 63%, respectivamente. A média ajustada de isolados sensíveis e resistentes à oxacilina que foram multirresistentes foi de 8 e 78%, respectivamente. Não houve efeito da ordem de parto (1, 2 e 3 ou mais partos) sobre a multirresistência às classes de antibióticos (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito da classificação dos isolados de S. aureus em adaptados e não adaptados, resistência à oxacilina e ordem de parto sobre a multirresistência às classes de antibióticos

Efeito	Coeficiente	Erro Padrão	Multirresistentes (%)[1]	IC 95%		*P*	Razão de chance
Multirresistência							
Intercepto	2.57	1.34		-0.08	5.23	0.0574	
AFLP[2]						0.0346	
Adaptados	-2,16	1.00	16,2	-4,15	-0,16	0.0346	0,11
Não Adaptados	Referência		62,6				
Oxacilina						0.0016	
Sensíveis	-3,70	1.14	8,2	-5,96	-1,43	0.0016	0,025
Resistentes	Referência		78,3				
NL[3]						0.6931	
1	0,14	1,36	44,7	-2,57	2,85	0,91	1,15
2	-0,77	1,03	24,4	-2,82	1,27	0,45	0,46
≥3	Referência		41,2				

Fonte: Pinheiro (2016).
[1]Multirresistentes (%): média ajustada do percentual de isolados resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos (classes de antibióticos avaliadas: beta-lactâmicos, cefalosporinas, rifamicina, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluorquinolonas e lincosamidas). [2]AFLP: Adaptados: isolados considerados adaptados à glândula mamária (pertencentes aos grupos A1 e A2); Não Adaptados: isolados considerados não adaptados à glândula mamária (pertencentes aos grupos A3 a A8). [3]NL: número de lactação

Um total de 7 isolados (6% do total de isolados) foram resistentes à oxacilina. Destes, 5 foram isolados do rebanho 4, e 2 do rebanho 5 (Quadro 6). Ambos os rebanhos localizavam-se da região do Vale do Paraíba, SP. Dos isolados que receberam a antibioticoterapia (6/7), 66,7% (4/6) não foram recuperados nas amostras pós tratamento. O único isolado que não recebeu antibioticoterapia (do grupo controle), foi recuperado nas coletas pós tratamento. Todos os isolados resistentes à oxacilina foram resistentes à penicilina e ampicilina, e 85,7% (6/7) destes isolados foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico.

Houve efeito do rebanho sobre a resistência à penicilina (P = 0.0006). A média ajustada de isolados resistentes à penicilina foi de 30%, no rebanho 3, nos demais rebanhos foi de aproximadamente 90%. Porém, não houve efeito da ordem de parto sobre a resistência à penicilina.

Não houve efeito da classificação dos isolados em adaptados e não adaptados à glândula mamária, número de lactação, fase do tratamento (lactação ou secagem) e resistência à qualquer um dos 12 antibióticos avaliados sobre a resposta dos isolados à antbioticoterapia (isolados do grupo Controle foram excluídos dessa última avaliação).

Quadro 6 - Descrição da associação entre os isolados classificados pelo AFLP e os rebanhos, resposta à antibioticoterapia e antibiograma

Classificação AFLP	N (%)	Associação com rebanhos	Associação com a resposta à antibioticoterapia	Associação com antibiograma
A1	65 (55,56)	Mais frequente em todos os rebanhos, exceto no rebanho 4.	60,9% curaram. Maior taxa de cura no rebanho 1 (83,3%), e menor no rebanho 5 (46,2%).	78,5% resistentes à penicilina. 2 isolados multirresistentes e 2 resistentes à oxacilina. 8 isolados sensíveis a todos os antibióticos.
A2	41 (35,04)	Mais frequente no rebanho 4.	76% curaram. Menor taxa de cura no rebanho 5 (40%).	85,4% resistentes à penicilina. 2 isolados multirresistentes e 1 resistente à oxacilina. 5 isolados sensíveis a todos os antibióticos
A3	1 (0,85)	Presente no rebanho 3.	Curou.	Resistência intermediária para enrofloxacina e sensível a todos os outros antibióticos.
A4	3 (2,56)	Presentes no rebanho 1.	100 % de cura.	2 isolados resistentes à penicilina e 1 sensível a todos os antibióticos.
A5	1 (0,85)	Presente no rebanho 3.	Grupo controle (não foi tratado).	Resistência intermediária para eritromicina e sensível a todos os outros antibióticos.
A6	1 (0,85)	Presente no rebanho 4.	Curou.	Multirresistente.
A7	4 (3,42)	Presentes no rebanho 4.	100% de cura.	3 isolados multirresistentes.
A8	1 (0,85)	Presente no rebanho 4.	Curou.	Multirresistente.

Fonte: Pinheiro, 2016.

4 DISCUSSÃO

Entre momento em que as vacas foram identificadas como infectadas por *S. aureus* até o início do tratamento na lactação e na secagem, transcorreu um período médio de 60 a 85 dias, respectivamente. Portanto, as vacas tratadas neste estudo estavam naturalmente infectadas por *S. aureus* há pelo menos 2 meses, sendo sugestivo assim de uma infecção crônica.

No tratamento durante a lactação, as taxas de cura ajustadas para os outros efeitos do modelo estatístico, foram de 77,3 e 84,2% para os quartos tratados com ATB e ATB + VAC, respectivamente. As taxas de cura observadas no presente estudo foram maiores do que as observadas em outros estudos que usaram terapia estendida (5 a 8 dias de tratamento). O tratamento com cefapirina intramamária (IMM) por 5 dias resultou em taxa de cura de 25,8% (n = 31 vacas) (ROY et al., 2009). O tratamento por 5 e 8 dias com ceftioufur IMM resultou em taxa de cura de 17 (n = 12 quartos) e 36% (n = 11 quartos), respectivamente (Oliver et al., 2004). No entanto, em 2 estudos foram observadas taxas de cura semelhantes às do presente estudo. No estudo de Deluyker et al. (2005), 53 quartos mamários foram tratados por 8 dias com Pirlimicina via intramamária, e a taxa de cura foi de 86%. Com o uso de mesmo protocolo de tratamento estendido por 8 dias, porém com menor número de quartos tratados, Gillespie et al. (2002) observaram uma taxa de cura de 83,3% (5/6 quartos).

Uma possível razão para as elevadas taxas de cura no tratamento durante a lactação, no presente estudo, pode ser a duração da terapia (BARKEMA et al., 2006). Roy e Keef (2012) em uma revisão sobre tratamento de mastite causada por S. aureus durante a lactação, concluíram que a terapia intramamária estendida por 5-8 dias foi a melhor opção terapêutica. Porém, deve-se considerar que o uso de terapias estendidas pode estar associado à infecções por microrganismos secundários, como leveduras e em alguns casos coliformes (MIDDLETON; LUBY, 2008; ROY; KEEFE, 2012). Além disso, a taxa de cura a longo prazo, mesmo com 8 dias de terapia com antibióticos intramamários, pode ser baixa. Num estudo de Middleton et al. (2007), a taxa de cura dos quartos após 4 dias do final do tratamento foi de 80%, porém, após 28 dias essa taxa de cura caiu para 29%. No presente estudo, a taxa de cura foi avaliada com base em três coletas de amostras de todos quartos até 28 dias após o tratamento, para minimizar o número de resultados falso-negativos. Além disso, os quartos foram considerados curados somente com 3 resultados negativos para S. aureus após o tratamento, sendo que outros autores sugerem que 2 resultados negativos para

S. aureus após o tratamento (geralmente 21 e 28 dias após o tratamento) seja o suficiente para que o quarto seja considerado como curado (SEARS et al., 1990; SCHUKKEN; DELUYKER, 1995; DELUYKER et al., 2005).

Outra razão para as elevadas taxas de cura no tratamento durante a lactação, pode ser o uso do antibiótico injetável à base de enrofloxacina. As principais características da enrofloxacina são: baixa toxicidade, alta biodisponibilidade, excelente penetração tecidual e longo tempo de meia vida no sangue (BROWN, 1996; LIZONDO et al., 1997). O leite não interfere significativamente na atividade antimicrobiana da enrofloxacina *in vitro* (FANG; PYÖRÄLÄ, 1996), e a classe de fluoroquinolonas (a qual a enrofloxacina pertence), podem ter efeito positivo sobre a modulação do sistema imune, pelo aumento da habilidade de matar dos neutrófilos (HOEBEN et al., 1997). Além disso, quando é distribuída na corrente sanguínea da vaca, a enrofloxacina é degradada pelo fígado dando origem a um metabólito (ciprofloxacina), que também apresenta ação bactericida. Após a administração sistêmica de enrofloxacina, altas concentrações de ciprofloxacina foram alcançadas e mantidas no sangue e no leite (KAARTINEN et al., 1995; RANTALA et al., 2002).

Houve tendência (P = 0,055) dos quartos mamários das primíparas tratadas na lactação apresentarem maior taxa de cura do que os quartos mamários de pluríparas. Quando a análise foi feita usando a vaca como unidade experimental, primíparas apresentaram maior taxa de cura do que pluríparas (P = 0,02), este resultado é similar ao relatado em outros estudos (ZIV; STORPER, 1985; SOL et al., 1997; PYORALA; PYORALA, 1998; TAPONEN et al., 2003; DELUYKER et al., 2005). A taxa de cura das primíparas tratadas com antibiótico (tratamentos ATB e ATB + VAC) foi de 100%. A maior taxa de cura das primíparas pode ter ocorrido porque: 1) vacas mais velhas podem apresentar infecções crônicas há mais tempo do que as infecções em vacas mais jovens, e o aumento da duração da infecção intramamária reduz a taxa de cura (SOL et al., 1994; 1997; DINGWELL et al., 2003), 2) o sistema imune das vacas torna-se menos efetivo de acordo com o aumento da idade (SOL et al., 1997), 3) o maior tamanho da glândula mamária das vacas adultas pode contribuir para reduzir as chances de cura, pois o antibiótico deve difundir e eliminar *S. aureus* em um volume maior de tecido (BARKEMA et al., 2006), 4) a prevalência de *S. aureus* resistentes à penicilina foi maior em vacas mais velhas do que em vacas mais jovens (SOL et al., 2000), e em outros estudos, a taxa de cura dos quartos infectados por *S. aureus* resistentes à penicilina foi menor do que a taxa de cura dos quartos infectados por *S. aureus* sensíveis à penicilina, mesmo quando foram utilizados antibióticos que não eram beta-lactâmicos (ZIV; STORPER, 1985; SOL et al., 1997; PYORALA; PYORALA, 1998; TAPONEN et al., 2003), porém, no presente estudo,

não houve efeito da resistência à penicilina sobre a taxa de cura, 5) a CCS dos quartos das primíparas foi menor do que a CCS dos quartos das pluríparas, antes do tratamento, e quartos com CCS ≤ 1.000.000 cél/mL apresentam maior chance de cura do que quartos com CCS > 1.000.000 cél/mL (SOL et al., 1997).

O estágio de lactação não teve efeito sobre a taxa de cura dos quartos mamários e das vacas. Em outros estudos, a taxa de cura das vacas no final da lactação (>200 DEL) foi maior do que a taxa de cura das vacas no início de lactação (<100 DEL) (SOL et al., 1997; DELUYKER et al., 2005). Wilson et al. (1972) hipotetizaram que o efeito do estágio da lactação era devido à mais rápida eliminação do antibiótico com a maior produção de leite no início da lactação. Os resultados do nosso estudo têm uma importante aplicação prática, considerando que não houve efeito do estágio de lactação sobre a taxa de cura, o tratamento das vacas no início da lactação pode gerar maior retorno financeiro, visto que estas vacas permaneceriam sadias por um período maior da lactação do que se fossem tratadas no final da lactação.

No tratamento durante a lactação, quartos mamários de vacas com apenas um quarto infectado por *S, aureus* apresentaram taxa de cura semelhante à dos quartos de vacas com dois ou mais quartos infectados por *S. aureus* (P = 0,16). Outros estudos relataram que quanto maior o número de quartos infectados por *S. aureus*, menor a chance de cura do quarto e da vaca (SOL et al., 1994; OSTERAS et al., 1999; JANOSI et al., 2001). No nosso estudo, esse efeito foi observado somente em nível de vaca, ou seja, vacas com dois ou mais quartos infectados por *S. aureus* tiveram menor taxa de cura (16,9 vs. 69,8%) do que vacas com apenas um quarto infectado (P = 0,04).

A posição dos quartos mamários não teve efeito sobre a taxa de cura (P = 0,44). Em outros estudos, os quartos posteriores tiveram menor taxa de cura do que os quartos anteriores (SOL et al., 1997; DELUYKER et al., 2005). Barkema et al. (2006) descreveram que a menor taxa de cura dos quartos posteriores pode ser devido ao maior volume destes quartos, quando comparados aos quartos anteriores (essa também é uma das hipóteses do porquê da maior taxa de cura das primíparas em relação às pluríparas). Os quartos posteriores produzem mais leite do que os quartos anteriores, o que poderia acelerar a eliminação do antibiótico, e também poderia ser uma razão para diminuir a taxa de cura.

Houve efeito da interação tratamento*vacinação na lactação sobre a CCS dos quartos mamários. Após a antibioticoterapia, a CCS dos quartos tratados com ATB + VAC foi menor do que a CCS dos quartos do grupo Controle. Em estudo recente, a mesma vacina utilizada no presente estudo diminuiu a taxa de proliferação de *S. aureus* em 45% (SCHUKKEN et al.,

2014). No presente estudo, a vacina pode ter reduzido a taxa de proliferação de *S. aureus* e, consequentemente, diminuído a migração de leucócitos para o interior da glândula mamária, o que resulta em menor CCS, ou alternativamente, aumentado a capacidade de eliminação de *S. aureus* nas vacas vacinadas.

Quatorze dias antes do início da antibioticoterapia na lactação, a primeira dose da vacina foi aplicada nas vacas do tratamento ATB + VAC, e destas vacas, foram coletadas amostras de leite por quarto mamário para análise de CCS. A média de CCS dos quartos do tratamento ATB + VAC aos 14 dias antes do tratamento foi de 881.000 cél/mL. Quando a segunda dose da vacina foi aplicada (no início da antibioticoterapia), a média de CCS destes quartos foi de 678.000 cél/mL. A terceira dose da vacina foi aplicada 14 dias após o início da antibioticoterapia, e a última coleta de CCS dos quartos foi 28 dias após o início da antibioticoterapia. Nesta última coleta, a média de CCS dos quartos do tratamento ATB + VAC foi de 266.000 cél/mL, vs. 1.089.000 cél/mL dos quartos do tratamento Controle (P = 0,01). Os quartos tratados somente com ATB, mesmo com uma taxa de cura de 77,3%, não apresentaram CCS menor do que os quartos do tratamento Controle (590.000 vs. 1.089.000 cél/mL, P = 0,15). É provável que a maior redução de CCS dos quartos do tratamento ATB + VAC seja devido à vacinação. Um dos prováveis mecanismos de ação da vacina contra *S. aureus* é a inibição da formação do biofilme por *S. aureus*, o que pode acelerar a eliminação dessa bactéria e a redução de CCS.

Independentemente do tratamento feito na lactação, a CCS de primíparas foi menor do que a CCS de pluríparas. A menor CCS das primíparas pode ter contribuído para a elevada taxa de cura dessas vacas (100% de cura das primíparas dos tratamentos ATB e ATB + VAC). Em estudos prévios, a alta CCS reduziu a taxa de cura de mastite clínica (SOL et al., 2000) e subclínica (SOL et al., 1997) causada por *S. aureus*.

No tratamento de secagem, as taxas de cura dos quartos mamários, ajustadas para os outros efeitos do modelo estatístico, foram de aproximadamente 100% em todos os tratamentos. As taxas de cura observadas no presente estudo foram maiores do que as observadas em outros estudos. Estudo prévios relataram taxas de cura dos quartos mamários de 63 a 68%, (BROWNING et al., 1990; ØSTERAS et al., 1994), sendo que, na secagem, pode ser esperada uma taxa de cura espontânea de *S. aureus* de 25 a 38% (ØSTERAS et al., 1991). Em outro estudo, o tratamento com cloxacilina benzatina (500 mg) ou tilmicosina (1500 mg), ambos via IMM, resultou em taxa de cura dos quartos mamários de 62,9 e 72,5% (n = 308 quartos), respectivamente (DINGWELL et al., 2003). Nos estudos de Browning et al. (1990) e Dingwell et al. (2003), os quartos tratados com cloxacilina benzatina

apresentaram taxa de cura semelhante, de aproximadamente 63%. No presente estudo, os quartos tratados apenas com cloxacilina (500 mg) + ampicilina (250 mg) apresentaram 100% de cura (20/20). Portanto, a maior taxa de cura no presente estudo poderia ser atribuída à ampicilina (apesar de, no resultado de antibiograma, 77% dos isolados terem sido resistentes à ampicilina). Porém, outros fatores afetam a chance de eliminação de *S. aureus* da glândula mamária, como características da vaca tratada e da cepa de *S. aureus* causadora da infecção (BARKEMA et al., 2006).

No que diz respeito aos fatores relacionados à vaca, estudos prévios descreveram que, na secagem, o aumento de: a) ordem de parto (SOL et al., 1994; OSTERAS et al., 1999), b) número de quartos posteriores infectados (SOL et al., 1994; OSTERAS et al., 1999; DINGWELL et al., 2003), c) CCS (SOL et al., 1994; OSTERAS et al., 1999; DINGWELL et al., 2003), d) número de amostras com isolamento positivo antes do tratamento (SOL et al., 1994; DINGWELL et al., 2003), e) unidades formadoras de colônia (DINGWELL et al., 2003) e f) número de quartos infectados (SOL et al., 1994; OSTERAS et al., 1999), diminui a chance de cura da vaca. No presente estudo, diferentemente do que foi relatado nos 3 estudos citados a cima, quartos posteriores e anteriores apresentaram mesma taxa de cura, e assim como no estudo de Dingwell et al. (2003), ordem de parto e número de quartos infectados não afetaram a taxa de cura da vaca. Não foi possível identificar nenhum fator relacionado à vaca que afetou a taxa de cura, uma vez que a taxa de cura de modo geral foi muito elevada.

Quanto aos fatores relacionados resistência aos antibióticos de *S. aureus*, foi observado que a resistência à penicilina e o agrupamento dos isolados de acordo com a variabilidade genética com base no AFPL, apresentaram efeito sobre a resposta à antibioticoterapia. *S. aureus* resistentes à penicilina apresentaram menor taxa de cura do que *S. aureus* sensíveis à penicilina (SOL et al., 1997; OSTERAS et al., 1999; SOL et al., 2000). Porém, no presente estudo, não houve efeito da resistência à penicilina sobre a taxa de cura, provavelmente porque houve uma elevada taxa de cura de todos os quartos mamários que receberam antibioticoterapia. Em estudo que avaliou a eficiência de tilmicosina ou cloxacilina benzatina na secagem, após o exame de tipificação molecular de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado, foi observado que os grupos predominantes de isolados, nomeados A, D, e F, responderam igualmente ao tratamento com tilmicosina (71, 75, e 80% de cura, respectivamente), porém houve uma diferença marcante na resposta ao tratamento com cloxacilina (46, 87, e 33% de cura, respectivamente) (DINGWELL et al., 2004). Luby e Middleton (2005) e Tikofsky e Zadoks (2005) relataram que isolados pertencentes aos grupos menos frequentes nos rebanhos (não adaptados), pareciam responder melhor à

antibioticoterapia (maior cura) do que isolados que eram dos grupos predominantes nos rebanhos (adaptados). O mesmo foi notado no presente estudo, pois os isolados dos grupos predominantes nos rebanhos (grupos A1 e A2, classificados como adaptados à glândula mamária) apresentaram 66,2% de cura, enquanto que os isolados dos grupos menos frequentes nos rebanhos (grupos A3 a A8, classificados como não adaptados à glândula mamária) apresentaram 100% de cura. Um total de 45,5% dos isolados não adaptados foram multirresistentes, e apenas 3,8% dos isolados adaptados foram multirresistentes, ou seja, a multirresistência não aumentou a resistência *in vivo* dos isolados à antibioticoterapia. No presente estudo, assim como nos estudos de Luby e Middleton (2005) e Tikofsky e Zadoks (2005), o total de isolados não adaptados foi baixo, portanto o teste estatístico utilizado não foi capaz de identificar uma diferença na taxa de cura entre isolados pertencentes aos grupos predominantes (adaptados) e menos frequentes (não adaptados) nos rebanhos.

O principal reservatório de *S. aureus* nos rebanhos foi a glândula mamária de vacas infectadas, porém *S. aureus* presentes no ambiente também foram capazes de causar IMM (Roberson et al., 1998). Estudos que avaliaram *S. aureus* de diferentes regiões do mundo, sugeriram que poucos clones adaptados à glândula mamária são responsáveis pela maioria das IIMs (KAPUR et al., 1995; ZADOKS et al., 2002). Smith et al. (2005), ao avaliarem *S. aureus* de diferentes países (Estados Unidos, Reino Unido e Chile), encontraram um complexo clonal (CC97) que foi comum em 87,4% de todos os isolados. Os autores concluíram que um único grupo clonal de *S. aureus* alcançou distribuição mundial e é responsável pela maioria das IIMs. Graber et al. (2009), identificaram uma cepa de *S. aureus* (Genótipo B), que foi associada à altas prevalências de IIMs em rebanhos e vacas da Suiça, enquanto que as cepas Genótipo C e Genóticpo G foram associadas à baixas prevalências nos rebanhos. Bardiau et al. (2016) avaliaram *S. aureus* de 4 países (Bélgica, Canada, Itália e Suiça), e dividiram os isolados em 2 grupos: *cap*8-*agr*II, que demonstraram baixa taxa de invasão; e *cap*5-*agr*I, que demonstraram alta taxa de invasão. Diversas técnicas foram usadas para dividir *S. aureus* em diferentes grupos, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (DINGWELL et al., 2004), Tipagem de Sequências Multilocus (SMITH et al., 2005), amplificação por PCR do espaçador intergênico 16S-23S rRNA (GRABER et al., 2009), genotipagem da cápsula (PCR), ensaios de invasão (células epiteliais bovinas) e produção de biofilme (Espectrofotometria) (BARDIAU et al., 2016). Todas essas técnicas foram capazes de diferenciar grupos de *S. aureus* que foram mais frequentes em todos os rebanhos, portanto foram considerados adaptados à glândula mamária. No presente estudo, a técnica de AFLP agrupou os isolados em 8 grupos, sendo que 2 destes grupos, A1 e A2, foram os mais

frequentes em todos os rebanhos, representando 90,6% do total de isolados, portanto esses grupos foram considerados adaptados à glândula mamária. Quando o resultado de AFLP foi comparado ao do antibiograma, os isolados adaptados e não adaptados também apresentaram diferença quanto à resistência aos antibióticos, 45,5 e 36,4% dos isolados não adaptados foram multirresistentes e resistentes à oxacilina, respectivamente, e apenas 3,8 e 2,8% dos isolados adaptados foram multirresistentes e resistentes à oxacilina, respectivamente. É provável que a transmissão e infecção das vacas por isolados adaptados tenha ocorrido pelo leite e equipamentos de ordenha, e que a fonte de infecção dos isolados não adaptados seja outra, como pele do teto, mãos de ordenadores ou o ambiente. Estudos prévios descreveram que isolados presentes no leite pertenceram à cepas diferentes do que isolados presentes na pele do teto, indicando uma especificidade não só pelo hospedeiro, mas também pelo local de infecção (BOOTH et al., 2001; ZADOKS et al., 2002).

O rebanho 4 foi o que apresentou maior diferença no perfil genético dos isolados de *S. aureus* estudados. Este foi o único rebanho em que os isolados (classificados pelo AFLP como) A2 foram os mais frequentes. Além disso, mais da metade (6/11) dos isolados não adaptados à glândula mamária pertecenciam a este rebanho. Talvez essa maior heterogeneidade de *S. aureus* neste rebanho seja devido à capacidade desta bactéria de sobreviver ao ambiente ou à falhas no manejo da rotina de ordenha (por exemplo a falta de uso de luvas pelos ordenhadores).

De acordo com os resultados do presente estudo, a probabilidade de um isolado não adaptado à glândula mamária ser multirresistente foi maior do que a de um isolado adaptado. Porém, a taxa de cura dos isolados não adaptados foi maior do que a de isolados adaptados, portanto o resultado de antibiograma não auxiliaria a tomada de decisão de para escolha de princípios ativios mais recomendados para o tratamento.

Os resultados do presente estudo forneceram informações de grande aplicabilidade para o tratamento de mastite subclínica causada por *S. aureus*. O tratamento de mastite subclínica causada por *S. aureus* durante a lactação tem sido considerado inviável por muitos pesquisadores, devido às baixas taxas de cura. No entanto, de acordo com o presente estudo, o presente protocolo de tratamento de mastite subclínica causada por *S. aureus* resultou em altas taxas de cura, inclusive em vacas com idade avançada e com múltiplos quartos infectados. Além disso, o presente estudo possibilitou caracterizar os isolados de *S. aureus* de acordo com a variabilidade genética, resposta ao tratamento e perfil de resistência aos antimicrobianos desta bactéria.

5 CONCLUSÕES

O tratamento com os antibióticos ampicilina e cloxacilina, aplicados via intramamária, associado com enrofloxacina por via intramuscular, atingiu taxas de cura de 84% contra mastite subclínica causada por *S. aureus* durante a lactação. O uso da vacinação contra *S. aureus* em conjunto com a antibioticoterapia não aumentou a taxa de cura no tratamento durante a lactação, porém foi eficiente em reduzir a CCS. Primíparas e vacas com apenas um quarto infectado, apresentaram maior taxa de cura do que pluríparas e vacas com dois ou mais quartos infectados, respectivamente. A terapia de secagem apresentou taxa de cura 80% em todos os tratamentos. A resistência à penicilina não afetou a taxa de cura dos isolados de *S. aureus*. A probabilidade de um isolado não adaptado à glândula mamária ser multirresistente e resistente à oxacilina foi maior do que a de um isolado adaptado, porém a taxa de cura dos isolados não adaptados foi maior do que a de isolados adaptados.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; DANGLER, C. A.; SORDILLO, L. M. 1995, Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Can J Vet Res**, v. 59, p. 124–128, 1995.

ALLORE, H, G.; ERB, H. N. Partial budget of the discounted annual benefit of mastitis control strategies. **J Dairy Sci**, v. 81, p. 2280–2291, 1998.

Barkema, H, W,, Y, H, Schukken, and R, N, Zadoks, 2006, *Invited Review:* The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis, J, Dairy Sci, 89:1877–1895.

Bartlett PC, Miller GY, Lance SE, et al. Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. Prev Vet Med 1992;12:59–71.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

Borm, A, A,, L, K, Fox, K, E, Leslie, J, S, Hogan, S, M, Andrew, S, P, Oliver, Y, H, Schukken, D, D, Hancock, C, T, Gaskins, W, E, Owens, and C, Norman, 2005, Prepartum intramammary antibiotic therapy: Effects on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers, Page 364–369 in Proc, 4th Int, Dairy Fed, Mastitis Seminar, Maastricht, The Netherlands, Wageningen Acad, Publ,, Wageningen, The Netherlands.

Bradley, A.J.; Green, M.J. Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. J. Clin. Microb. v.39, p.1845-1849, 2001.

Bradley AJ, Green MJ. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. J Dairy Sci 2009;92(5):1941–53.

Bramley AJ, Sources of Streptococcus uberis in the dairy herd, I, Isolation from bovine faeces and from straw bedding of cattle, J Dairy Res 1982;49:369–73.

Brown, S.A., 1996. Fluoroquinolones in animal health. J. Vet. Pharmacol. Therap. 19, 1–14.

Browning J. W., G. A. Mein, M. Barton. T. J. Nicholls, and P. Brightling. 1990. Effect of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry cow period and early lactation. Aust. Vet. J. 67:440–442.

Burton, J.L. E Erskine, R.J. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., v.19, p.1-45, 2003.

CLSI. 2013. Performances standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 2nd Informational Supplement. VET01-S2. CLSI, Wayne, PA.

CLSI, 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19. CLSI, Wayne, PA.

Constable PD, Morin DE. Use of antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens isolated from the milk of dairy cows with clinical mastitis to predict response to treatment with cephapirin and oxytetracycline. J Am Vet Med Assoc 2002;221(1):103–8.

Costa, E, O,, N, R, Benites, J, L, Guerra, and P, A, Melvilla, 2000,Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* spp, isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows, J, Vet, Med, B 47:99–103.

Davidson, I, 1961, The epidemiology of staphylococcal mastitis, Vet, Rec, 73:1015-1018.

Deluyker, H, A,, S, N, Van Oye, and J, F, Boucher, 2005, Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows, J, Dairy Sci, 88:604–614.

Dijkhuizen AA, Renkema JA & Stelwagen J 1991 Modelling to support animal health control, Agricultural Economics 5 263–277.

Dingwell, R, T,, K, E, Leslie, T, F, Duffield, Y, H, Schukken, L, DesCoteaux, G, P, Keefe, D, F, Kelton, K, D, Lissemore, W, Shewfelt, P, Dick, and R, Bagg, 2003, Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of Staphylococcus aureus infection in the dry period, J, Dairy Sci, 86:159–168.

Dingwell, R. T., K. E. Leslie, J. Pacan, D. Lepp, and P. Sabour. 2004. The influence of the pulsed-field gel electrophoresis molecular type of subclinical Staphylococcus aureus on dry period elimination in Canadian dairy herds. Proc.43rd Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc., Charlotte, NC. Natl. Mastitis Counc., Madison, WI.

Djabri B,, Bareille N,, Beaudeau F,, Seegers H,, Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis, Vet, Res, 33 (2002) 335–357.

Dodd, F,H,, D,R, Westgarth, F,K, Neave, and R,G, Kingwill, 1969, Mastitis – the strategy of control, J, Dairy Sci, 52:689-695.

Dohoo, I,R, and A, H, Meek, 1982, Somatic cell counts in bovine milk, Can, Vet, J, 23:119.

Dohoo I,R,, Leslie K,E,, Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections, Prev, Vet, Med, 10 (1991) 225–237.

Dohoo I, R,, J, Smith, S, Andersen, D, F, Kelton, S, Godden, and Mastitis Research Workers' Conference, 2011, Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample, J, Dairy Sci, 94:250–261.

Erskine R, Cullor J, Schaellibaum M, et al, Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs, National Mastitis Council Research Committee Report, In: Proceedings of the National Mastitis Council, Verona (WI): National Mastitis Council; 2004, p, 400–14.

Erskine RJ, Bartlett PC, VanLente JL, et al, Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle, J Dairy Sci 2002;85:2571–5.

Fang, W., and S. Pyörälä. 1996. Mastitis-causing Escherichia coli: Serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. J. Dairy Sci. 79:76–82.

FOSS, Fossomatic™ FC: Reference manual, Hilleroed, 2008.

Fox, L,K,, S,T, Chester, J,W, Hallberg, S,C, Nickerson, J,W, Pankey, and L,D, Weaver, 1995, Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition, J, Dairy Sci, 78:1619-1628.

Gillespie, B,E,, Jayarao BM, Oliver SP, Identification of streptococcus species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting, J Dairy Sci 1997;80(3):471–6.

Gillespie, B, E,, H, Moorehead, P, Lunn, H, H, Dowlen, D, L, Johnson, K, C, Lamar, M, J, Lewis, S, J, Ivey, J, W, Hallberg, S, T, Chester, and S, P, Oliver, 2002, Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental Streptococcus spp, and Staphylococcus aureus intramammary infections in lactating dairy cows, Vet, Ther, 3:373–380.

Gonçalves J. L, Tomazi T., Barreiro J. R., Braga P. A. C., Ferreira C. R., Junior J. P. A.., Eberlin M. N., Santos M. V. 2014. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Veterinary Microbiology Volume 173, Issues 1–2, 17 September 2014, Pages 147–151.

GoTaq Green Mastermix, Reference manual, Promega WI, USA.

Gurjar, A, Genetic Diversity of Staphylococcus aureus Strains Isolated from Bovine Milk Using RAPD-PCR, 3rd International Symposium on Mastitis and Milk Quality St, Louis, Missouri; 2011.

Hageltorn and Saad, 1986, Flow cytofluorometric characterization of bovine blood and milk leukocytes Am, J, Vet, Res,, 47 (1986), pp, 2012–2016.

Halasa T, Huijps K, Østera°s O & Hogeveen H 2007 Economic effects of bovine mastitis and mastitis management : A review, Veterinary Quarterly 29 18–31.

Hallberg JW, Watts JL, Wachowski MB, et al, Field efficacy and dose concentration study for an intramammary formulation of ceftiofur for the treatment of clinical mastitis in lactating dairy cattle, In: Proceedings of 2nd Annual International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver (British Columbia), Madison (WI): National Mastitis Council; 2001, p, 238–41.

Harro, J. M., B. M. Peters, G. A. O'May, N. Archer, P. Kerns, R. Prabhakara, and M. E. Shirtliff. 2010. Vaccine development in Staphylococcus aureus: Taking the biofilm phenotype into consideration. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59:306–323.

Haveri, M,, S, Taponen, J, Vuopio-Varkila, S, Salmenlinna, and S, Pyo¨ra¨ la¨ , 2005b, Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection, J, Clin, Microbiol, 43:959–961.

Hillerton, J, E,, A, J, Bramley, R, T, Staker, and C, H, McKinnon, 1995, Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures, J, Dairy Res, 62:39–50,

HOGAN, J,S,, GONZÁLEZ, R,N,, HARMON, R,J,, NICKERSON, S,C,, OLIVER, S,P,, PANKEY, J,W,, SMITH, K,L, Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, Rev, Ed, The National Mastitis Council, Madison, WI, 1999,

Hogan J, Smith KL, 2003a, Coliform mastitis, Vet Res 2003;34:507–19.

Hogan J, Smith KL, 2003b, Environmental streptococcal mastitis: facts, fables, and fallacies, In: Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the National Mastitis Council, Fort Worth (TX), Verona (WI): National Mastitis Council, Inc; 2003, p, 162–71.

Hogan J, Smith KL, 2012. Managing environmental mastitis. Vet Clin Food Anim 28: 217-224.

Honkanen-buzalski, T, Sampling technique, transportation and history, In: The bovine udder and mastitis, Eds, Sandholm, M,, Honkanen-Buzalski, T,, Kaartinen, L,, Pyörälä, S, Gummerus, Jyväskylä, Finland, pp, 111-114, 1995.

Hortet P & Seegers H 1998a Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows, Preventive Veterinary Medicine 37 1–20.

Houben EH, Huirne RB, Dijkhuizen AA & Kristensen AR 1994 Optimal replacement of mastitis cows determined by a hierarchic Markov Process, Journal of Dairy Science 77 2975–2993.

Hoeben, D., H. Dosogne, R. Heynman, and C. Burvenich. 1997. Effect of antibiotics on the phagocytotic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. Eur. J. Pharmacol. 332:289–297.

Huijps K & Hogeveen H 2007 Stochastic modeling to determine the economic effects of blanket, selective, and no dry cow therapy, Journal of Dairy Science 90 1225–1234.

International Dairy Federation, Bovine mastitis, Definitions and guidelines for diagnosis, Bulletin 24, Brussels, Belgium, 1987.

Janosi, S., A. Huszenicza, T. Horvath, F. Gemes, M. Kulcsar, and G. Huszenicza. 2001. Bacteriological recovery after intramuscular or intracisternal spiramycin-based drying-off therapy. Acta Vet. Hung. 49:155–162.

Jayarao, B, M,, and S, P, Oliver, 1994, Polymerase chain reactionbased DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk, J, Food Prot, 57:240-248.

Jayarao, B, M,, S, P, Oliver, K, R, Matthews, and S, H, King, 1991, Comparative evaluation of Vitek Gram-Positive identification system and API Rapid Strep System for identification of *Streptococcus* species of bovine origin, Vet, Microbiol, 26:301.

Kaartinen, L., M. Salonen, L. Älli, and S. Pyörälä. 1995. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. J. Vet. Pharmacol. Ther. 18:357–362.

Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. J Hosp Infect. 1999; 43: 33-37.

Kruze J, Bramley AJ, Sources of Streptococcus uberis in the dairy herd, II, Evidence of colonization of the bovine intestine by Str, uberis, J Dairy Res 1982;49:375–9.

Laevens H, Deluyker H,, Schukken Y,H,, De Meulemeester L,, Vandermeersch R,, De Muelenaere E,, De Kruif A,, Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows, J, Dairy Sci, 80 (1997) 3219–3226.

Lam, T, J, G, M,, M, C, M, de Jong, Y, H, Schukken, and A, Brand, 1996, Mathematical modeling to estimate efficacy of postmilking teat disinfection in split-udder trials of dairy cows, J, Dairy Sci, 79:62–70.

Langlois, B, E,, R, J, Harmon, and K, Akers, 1983, Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with API Staph Ident system, J, Cin, Microbiol, 18:1212.

Lago A, Godden S,M,, Bey, R,, et al, The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I, Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes, J Dairy Sci 2010;94:4441–56.

Leslie K,E,, Schukken Y,H,, Sargeant J,, Mitchell M,, Inhibitor violations during 10 years in Ontario, Association with Somatic Cell Count reduction program, Report to the Ontario Buro of Veterinary drugs, 1997.

Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., Estelrich, J., 1997. Physicochemical properties of enrofloxacin. J. Pharm. Biomed. Analysis. 15, 1845–1849.

Luby, C. D., and J. R. Middleton. 2005. Efficacy of vaccination and antibiotic therapy against Staphylococcus aureus mastitis in dairy cattle. Vet. Rec. 157:89–90.

Malek dos Reis, C., B., Barreiri, J., R., Mestieri, L., Porcionato, M., A., F., Santos, M., V. 2013. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows.

Matthews, K, R,, S, P, Oliver, and S, H, King, 1990, Comparison of Vitek gram-positive identification system with API Staph- Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin, J, Clin, Microbiol, 28: 1649-1651.

McDougall. S., 1998. Efficacy of two antimicrobial treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. New Zeland Veterinary Journal, 46, 226-232.

McLauchlin, J., Ripabelli, G., Brett, M.M., Threlfall, E.J., 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of Clostridium perfringens for epidemiological typing. International Journal of Food Microbiology 56, 21–28.

Middleton, J,R,, L,K, Fox, and T,H, Smith, 2001, Management strategies to decrease the prevalence of mastitis caused by one strain of Staphylococcus aureus in a dairy herd, J, Am, Vet, Med, Assoc, 218:1615-1618.

Middleton, J,R,, and L,K, Fox, 2002a, Influence of *Staphylococcus aureus* strain on mammary quarter milk production, Vet Rec, 150(13):411-413.

Middleton, J,R,, L,K, Fox, J,M, Gay, J,W, Tyler, and T,E, Besser, 2002b, Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in Staphylococcus aureus strain populations between dairy herds with different cattle importation practices, Epidemiol, Infect, 129:387-395.

Middleton, J,R,, L,K Fox, J,M, Gay, J,W, Tyler, and T,E, Besser, 2002c, Influence of Staphylococcus aureus strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and N-acetyl-BD-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies, J, Dairy Sci, 85:1133-1140.

Middleton JR, Ma J, Rinehart CL, Taylor VN, Luby CD, Steevens BJ. 2006. Efficacy of different Lysigin formulations in the prevention of Staphylococcus aureus intramammary infection in dairy heifers. J Dairy Res. 73(1):10-9.

Middleton, J.R., G.R. Bader, and R.B. Corbett. 2007. Use of pulsed-field gel electrophoresis to evaluate the success of treatment of Staphylococcus aureus mastitis. Proceedings of the 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council. San Antonio, TX. Pages 202-203.

Middleton, J.R., and C.D. Luby. 2008. Escherichia coli mastitis in cattle being treated for Staphylococcus aureus intramammary infection. Vet. Rec. 162:156-157.

National Mastitis Council, Gram-negative bacteria, In: Laboratory handbook on bovine mastitis, Madison (WI): The National Mastitis Council, Inc; 1999, p, 85-115,

National Mastitis Council, 2001, National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program, http://www,nmconline,org/ docs/NMC10steps,pdf Accessed Mar, 28, 2006.

National Mastitis Council (NMC), Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, Madison - Wi, NMC Inc,, ed,4, p,47, 2004.

Neave, F,K,, F,H, Dodd, and R,G, Kingwill, 1966, A method of controlling udder disease, Vet, Rec, 78:521-523.

Neave, F, K,, F, H, Dodd, R, G, Kingwill, and D, R, Westgarth, 1969, Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management, J, Dairy Sci, 52:696–707.

Nickerson, S,C,, W,E, Owens, and R,L, Boddie, 1995, Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control, J, Dairy Sci, 78:1607-1618.

Nickerson, S.C., W.E. Owens, G.M. Tomita, and P. Widel. 1999. Vaccinating dairy heifers with a Staphylococcus aureus bacterin reduces mastitis at calving. Large Animal Practice. 20:16-28.

Ohtsuka H, Mori K, Hatsugaya A, et al, Metabolic alkalosis in coliform mastitis, J Vet Med Sci 1997;59:471–2.

Olde Riekerink R, Barkema H, Poole D, et al. Risk factors for incidence rate of clinical mastitis in a nationwide study on Canadian dairy farms. In: Proceedings of the 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council. San Antonio (TX): National Mastitis Council, Madison, WI, 2008. p. 204.

Oliver, S, P,, K, R, Matthews, and B, M, Jayarao, 1990, Advances in mastitis diagnosis, Page 287 in Proc, Am, Assoc, Bovine Prac,/Natl, Mastitis Counc, Int, Symp, Bovine Mastitis, Indianapolis, IN, Natl, Mastitis Counc,, Inc,, Arlington, VA.

Oliver, S, P,, R, A, Almeida, B, E, Gillespie, S, J, Ivey, H, Moorehead, P, Lunn, H, H, Dowlen, D, L, Johnson, and K, C, Lamar, 2003, Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced Streptococcus uberis intramammary infections in lactating dairy cattle, Vet, Ther, 4:299–308.

Oliver SP, Gillespsie BE, Headrick SJ, et al. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. J Dairy Sci 2004;87: 2393-400.

Oliveira, L, and P, L, Ruegg, 2014, Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin, J, Dairy Sci, 97:5426–5436.

Oliveira, C,S,F,, H, Hogeveen, A,M, Botelho, P,V, Maia, S,G, Coelho and J,P,A, Haddad, 2015, Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle, Preventive Veterinary Medicine 121 (2015) 297–305.

Östensson K,, M, Hageltorn, G, Astrom, Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows, Acta Vet, Scand,, 29 (1988), pp, 493–500.

Osteras, O., V. L. Edge, and S. W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. J. Dairy Sci. 82:1221–1231.

Østeras, O., L. Sandvik, J. Aursjø, G. G. Gjul, and A. Jørstad. 1991. Assessment of strategy in selective dry cow therapy for mastitis control. J. Vet. Med. B 38:513–522.

Østeras, O., L. Sandvik, J. Aursjø, G. G. Gjul, and A. Jørstad. 1994. Effect of dry cow therapy on subclinical mastitis—an evaluation of long-acting and short-acting injectors. J. Vet. Med. B 41:529–540.

Østergaard S, Chagunda MGG, Friggens NC, Bennedsgaard TW & Klaas IC 2005 A stochastic model simulating pathogen specific mastitis control in a dairy herd, Journal of Dairy Science 88 4243–4257.

Owens, W, E,, and S, C, Nickerson, 1989, Morphologic study of *Staphylococcus aureus* L-form, reverting, and intermediate colonies in situ, J, Clin, Microbiol, 27:1382–1386.

Owens, W, E,, C, H, Ray, R, L, Boddie, and S, C, Nickerson, 1988, Antibiotic treatment of mastitis: Comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies, J, Dairy Sci, 71:3143–3147.

Owens, W, E,, C, H, Ray, R, L, Boddie, and S, C, Nickerson, 1997, Efficacy of sequential intramammary antibiotic treatment against chronic *Staphylococcus aureus* intramammary infection, Large Anim, Pract, 18:10–14.

Owens, W,E,, S,P, Oliver, B,E, Gillespie, C,H, Ray, and S,C, Nickerson, 1998, Role of horn flies (Haematobia irritans) in Staphylococcus aureus-induced mastitis in dairy heifers, Am, J, Vet, Res, 59:1122-1124.

Pacheco, A, B,, B, E, Guth, K, C, Soares, L, Nishimura, D, F, de Almeida and L, C, Ferreira, Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from humans, *J, Clin, Microbiol,* 1997, 35(6): 1521.

Palisade 2002 Guide to Using @Risk, Palisade Corporation, Newfield, NY, USA.

Pechorsky, A., Nitzan, Y. & Lazarovitch, T. Identification of pathogenic bacteria in blood cultures: Comparison between conventional and PCR methods. J. Microbiol. Methods 78, 325–330 (2009).

Persson Waller, K,, U, Gronlund, and A, Johannisson, 2003, Intramammary infusion of beta 1,3-glucan for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis, J, Vet, Med, B Infect, Dis, Vet, Public Health 50:121–127.

Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, et al, Genomic typing of enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources, J Dairy Sci 2008;91: 615–9.

Piepers, S,, K, Peeters, G, Opsomer, H,W, Barkema, K, Frankena, and S, De Vliegher, 2011, Pathogen-specific risk factors at the herd, heifer and quarter level for intramammary infections in early lactating dairy heifers, Prev, Vet, Med, 99:91-101.

Pillai S,R,, Kunze E,, Sordillo L,M,, Jayarao B,M,, Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health, J, Dairy Sci, 84 (2001) 1413–1420.

Pinzón-Sanchez C, Cabrera VE, Ruegg PL. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. J Dairy Sci 2011;94(4):1873–92.

Pyorala,S.H.,e E.O.Pyorala. 1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989–1995). J. Am. Vet. Med. Assoc. 212:407–412.

Philpot W,N,; Nickerson S,C, Vencendo a luta contra mastite, Naperville – IL: Westfalia Surge Inc,, 2000, 192p.

Pol M, Ruegg P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. J Dairy Sci 2007;90:262–73.

Poutrel, B,, and H, R, Ryniewicz, 1984, Evaluation of API 20 Strep System for species identification of streptococci isolated from bovine mastitis, J, Clin, MicrobioL 19:213-214.

Prenafeta, A., R. March, A. Foix, I. Casals, and L. Costa. 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a Staphylococcus aureus biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from Staphylococcus aureus induced mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 134:208–217.

Preisler, M.T.; Weber, P.S.D.; Tempelman, R.J.; et al. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient period. Am. J. Vet. Res., v.61, p.14-19, 2000.

Ranjan, R., Swarup, D., Patra R. C., Nandi D., 2006. Bovine protothecal mastitis: a review. Perspectives in agriculture, veterinary sciences. Nut. Nat. Res. 1 (17), 1 – 7.

Rantala, M., L. Kaartinen, E. Välimäki, M. Stryrman, M. Hiekkaranta, A. Niemi, L. Saari, and S. Pyörälä. 2002. Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced Escherichia coli mastitis. J. Vet. Pharmacol. Ther. 25:251–258.

Redelman D,, S, Butler, J, Robison, D, Garner Identification of inflammatory cells in bovine milk by flow cytometry Cytometry, 9 (1988), pp, 463–468.

Reksen, O,, L, Sølverød, A, J, Branscum, and O, Østerås, 2006, Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle, J, Dairy Sci, 89:2928–2937.

Reksen, O,, L, Sølverød, and O, Østerås, 2007, Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy dattle, J, Dairy Sci, 90:4670–4678.

Remmen, J, W, A,, J, M, J, van de Laar, and F, H, J, Jaartsveld, 1982, The effect of treatment with Nafpenzal MC of all cows with subclinical mastitis in 15 dairy herds, Page 1059 in Proc, 12th World Congr, Dis, Cattle, Amsterdam, The Netherlands, World Assoc, Buiatrics, Toulouse, France.

Roberson, J,R,, L,K, Fox, D,D, Hancock, J,M, Gay, and T,E, Besser, 1998, Sources of intramammary infections from Staphylococcus aureus in dairy heifers at first parturition, J, Dairy Sci, 81:687-693.

Roberson JR, Warnick LD, Moore G, 2004, Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin and frequent milk-out treatment versus no treatment, J Dairy Sci 2004;87:583–92.

Roberson JR, 2008, Apparent efficacy of blanket clinical mastitis treatment, In: Proceedings of 41st Annual Convention American Association of Bovine Practitioners, Charlotte (NC), Stillwater (OK): Frontier Printers Inc,; 2008, p, 288.

Roberson JR, 2010, Clinical mastitis: The first eight days, In: Proceedings of 43rd Annual Conference American Association of Bovine Practitioners, Albuquerque (NM),Stillwater (OK): VM Publishing Company; 2010, p, 124–33.

Roberson JR, 2012, Treatment of clinical mastitis, Vet Clin Food Anim 28 (2012) 271–288.

Rosenberg JB, Love B, Patterson DL. Bacterial cure and somatic cell count response of dairy cows with a positive California mastitis test at calving to therapy with cephapirin sodium. Vet Ther 2002.

Roy J-P, DesCôteaux L, DuTremblay D, et al. Efficacy of a 5 day extended therapy during lactation with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. Can Vet J 2009;50: 1257-62.

Roy, J.P., and G. Keefe. 2012. Systematic Review: What is the best antibiotic treatment for Staphylococcus aureus intramammary infection of lactating cows in North America? Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 28:39-50.

Royster, E., Wagner, S., 2015. Review. Treatment of mastitis in catle. Vet Clin Food Anim 31: 17–46.

Ruegg P, 2012, New Perspectives in Udder Health Management, Vet Clin Food Anim 28, 149–163.

Saad A,M,, K, Östensson, Flow cytofluorometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows Am, J, Vet, Res,, 51 (1990), pp, 1603–1607.

Sandgreen C. H., Waller K. P., Emanuelson U. 2006. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastites during lactation. The Veterinary Journal 175 (2008) 108–117.

Scha¨llibaum, M,, J, Nicolet, and J, Bosson, 1981, Treatment of chronic subclinical staphylococcal mastitis in lactating cows by administrating high doses of spiramycin, Schweiz, Arch, Tierheilkd, 123:277–292, [In German]

Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH & Oliver SP 2001 Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters, Journal of Dairy Science 84 1407–1412.

Schepers A,J,, Lam T,J,, Schukken Y,H,, Wilmink J,B,, Hanekamp W,J,, Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters, J, Dairy Sci, 80 (1997) 1833–1840.

Schukken, Y.H., Deluyker, H.A., 1995. Design of filed trials for the evaluation of antibacterial products for therapy of bovine clinical mastitis. J. Vet. Pharmacol.Ther. 18, 274–283.

Schukken YH, Bennett GJ, Zurakowski MJ, et al. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. J Dairy Sci 2011;94(12):6203–15. 13.

Schukken Y.H., Bronzo V., Locatelli C., Pollera C., Rota N., Casula A., Testa F., Scaccabarozzi L., March R., Zalduendo D., Guix R., e Moroni P., 2014. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds, J. Dairy Sci. 97 :5250–5264.

Schukken Y, H,, Wilson D, J,, Welcome F,, Garrison-Tikofsky L,, Gonzalez R, N, Review article, Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts, Vet, Res, 34 (2003) 579–596.

Schukken Y. H, Zurakowski M. J., Rauch B. J., et al. Non inferiority trial comparing a first generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. J Dairy Sci 2013;96(10):6763–74.

Sears, P, 2002, Staphylococcal vaccines: What are the new strategies? Pages 86–92 in Proc, 41st Ann, Mtg, Natl, Mastitis Counc,, Orlando, Florida, Natl, Mastitis Counc, Inc,, Madison, WI.

Sears, P, M; Smit, B. S., English, P, B,; Herer, P, S,; Gonzalez, R, N, Shedding pattern of Staphylococcus aureus from bovine intramammary infections, Journal of Dairy Science, v, 73, p, 2785-2789, 1990,

Seegers, H,, C, Fourichon, and F, Beaudeau, 2003, Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds, Vet, Res, 34:475–491.

Seymor E. H., Jones, G. M., McGilliard, M. L., 1989. Effectiveness of intramammary antimicrobial therapy based on somatic cell count. Journal of Dairy Science 72, 1057-1062.

Shephard, R. W., Malmo J., Pfeiffer, D. U., 2000. A clinical trial to evaluate the effectiveness of antimicrobial treatment of lactating cows with high somatic cell count in their milk. Australian Veterinary Journal 78, 763-768.

Silva, Breno de Oliveira., 2006. Manejo de rebanhos leiteiros com problemas causados por Stahylococcus aureus. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Smith, T, H,, L, K, Fox, and J, R, Middleton, 1998, Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd, J, Am, Vet, Med, Assoc, 212:553–556.

Smith, K. L., Hogan, J. S. 1992. Enviromental mastitis. Large Anim Vet 47: 16–20.

Smith, E, M,, L, E, Green, G, F, Medley, H, E, Bird, L, K, Fox, Y, H, Schukken, J, V, Kruze, A, J, Bradley, R, N, Zadoks, and C, G, Dowson, 2005, Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates, J, Clin, Microbiol, 43:4737–4743.

Smith, G.W., R.L. Lyman, and K.L. Anderson. 2006. Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intramammary Staphylococcus aureus infections in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228:422-425.

Sol, J,, O, C, Sampimon, J, J, Snoep, and Y, H, Schukken, 1994, Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis with antibiotics, J, Dairy Sci, 77:75–79.

Sol, J,, O, C, Sampimon, J, J, Snoep, and Y, H, Schukken, 1997, Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, J, Dairy Sci, 80:2803–2808.

Sol, J., O. C. Sampinon, J. J. Snoep, and Y. H. Schukken. 1997. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci. 80:2803–2808.

Sol, J,, O, C, Sampimon, H, W, Barkema, and Y, H, Schukken, 2000, Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, J, Dairy Sci, 83:278–284.

Sordillo L,M,, Shafer-Weaver K,, DeRosa D,, Immunobiology of the mammary gland, J, Dairy Sci, 80 (1997) 1851–1865.

Sordillo, L.M.; Streicher, K. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J. Mam. Gland. Biol. And Neop.v.7(2), p. 135-146, 2002.

Sutra, L,, and B, Poutrel, 1994, Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus, J, Med, Microbiol, 40:79-89,

Swinkels, J. M., H. Hogeveen, and R. N. Zadoks. 2005a. A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical Staphylococcus aureus mastitis. J. Dairy Sci. 88:4273– 4287.

Swinkels JM, Rooijendijk JGA, Zadoks RN & Hogeveen H 2005b. Use of partial budgeting to determine the economic benefits of antibiotic treatment of chronic subclinical mastitis caused by Streptococcus uberis or Streptococcus dysgalactiae, Journal of Dairy Research 72 75–85.

Steeneveld, W., J. Swinkels, and H. Hogeveen. 2007. Stochastic modelling to assess economic effects of treatment of chronic subclinical mastitis caused by Streptococcus uberis. J. Dairy Res. 74:459–467.

Taponen,S.,A. Jantunen, E. Pyorala, e S.Pyorala.2003. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant Staphylococcus aureus. Acta Vet. Scand. 44:53–62.

Tomazi T., Freitas R. L., Modena A. O., Ferreira G. C., Gonçalves J. L., Santos M. V. Prevalence of pathongens and severity of clinical mastitis in dairy herds of southeast brazil. 54th National Mastitis Council.

Tikofsky, L. L., and R. N. Zadoks. 2005. An alternative treatment trial for Staphylococcus aureus mastitis in organically managed dairy cattle. Pages 358–363 in Proc. 4th Int. Dairy Fed. Mastitis Seminar, Maastricht, The Netherlands. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.

Timms, L, L, 1995, Evaluation of pirlimycin for blitz therapy of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows, Pages 140– 141 in Proc, 34th Annu, Mtg Natl, Mastitis Counc,, Fort Worth, TX, Natl, Mastitis Counc, Inc,, Madison, WI.

Trinidad, P,, S,C, Nickerson, and T,K, Alley, 1990, Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers, J, Dairy Sci, 73:107-114.

Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P. et al., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infection 13, 1–46.

Vosough-Ahmadi B, Velthuis AG, Hogeveen H & Huirne RB 2006 Simulating Escherichia coli O157:H7 transmission to assess effectiveness of interventions in Dutch dairy-beef slaughterhouses, Preventive Veterinary Medicine 77 15–30.

Wang, G,, T, S, Whittam, C, M, Berg, and D, E, Berg, 1993, RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains, Nucleic Acids Res, 21:5930–5933.

Wenz JR ,Barrington GM, Garry FB ,et al, Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows, J Am Vet Med Assoc 2001;219:976–81.

Wenz JR, Garry FB, Barrington GM, Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis, J Am Vet Med Assoc 2006;229:259–62.

Williams, J.M., H.J. Mayerhofer, and R.W. Brown. 1966. Clinical evaluation of a Staphylococcus aureus bacterin (polyvalent somatic antigen). Vet. Med. Small Anim. Clin. 61:789-793.

Williams, J.M., G.R. Shipley, G.L. Smith, and D.L. Gerber. 1975. A clinical evaluation of a Staphylococcus aureus bacterin in the control of staphylococcal mastitis in cows. Vet. Med. Small Anim. Clin. 70:587-594.

Wilson, C,D,, and I, Davidson, 1961, The control of staphylococcal mastitis, Vet, Rec, 73:321-323.

Wilson, C, D,, D, R, Westgarth, R, G, Kingwill, T, K, Griffin, F, K, Neave, and F, H, Dodd, 1972, The effect of infusion of sodium cloxacillin in all infected quarters of lactating cows in sixteen herds, Br, Vet, J, 128:71–85.

Wilson, D, J,, R, N, Gonzalez, and P, M, Sears, 1995, Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: Effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count, J, Dairy Sci, 78:2083–2085.

Wilson, D, J,, R, N, Gonzalez, K, L, Case, L, L, Garrison, and Y, T, Gro¨hn, 1999, Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens, J, Dairy Sci, 82:1664–1670.

Wilson DJ, Sears PM, Gonzalez RN, et al. Efficacy of florflenicol for treatment of clinical and subclinical bovine mastitis. AJVR 1996;57: 526-8.

Zadoks, R, N,, W, B, van Leeuwen, H, W, Barkema, O, C, Sampimon, H, Verbrugh, Y, H, Schukken, and A, van Belkum, 2000, Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiology of bovine and human *Staphylococcus aureus*, J, Clin, Microbiol, 38:1931–1939.

Zadoks, R, N,, H, G, Allore, H, W, Barkema, O, C, Sampimon, Y, T, Gröhn, and Y, H, Schukken, 2001, Analysis of an outbreak of Streptococcus uberis mastitis, J, Dairy Sci, 84:590–599.

Zadoks, R, N,, H, G, Allore, T, J, Hagenaars, H, W, Barkema, and Y, H, Schukken, 2002a, A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds, Epidemiol, Infect, 129:397–416.

Zadoks, R, N,, W, B, Van Leeuwen, D, Kreft, L, K, Fox, H, W, Barkema, Y, H, Schukken, and A, van Belkum, 2002b, Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing, J, Clin, Microbiol, 40:3894– 3902.

Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP & Schukken YH 2003 Clinical, epidemiological and molecular characteristics of Streptococcus uberis infections in dairy herds, Epidemiology and Infection 130 335–349.

Ziv, G,, and M, Storper, 1985, Intramuscular treatment of subclinical staphylococcal mastitis in lactating cows with penicillin G, methicillin and their esters, J, Vet, Pharmacol, Ther, 8:276–283.

Ziv G, Shem-Tov M, Ascher F, Combined effect of ampicillin, colistin and dexamethasone administered intramuscularly to dairy cows on the clinico-pathological course of E-coli-endotoxin mastitis, Vet Res 1998;29:89–98.