TIAGO TOMAZI

Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa

Pirassununga

2013

TIAGO TOMAZI

Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa

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. Phd. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2013

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.2801 Tomazi, Tiago
FMVZ Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa / Tiago Tomazi. -- 2013.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Phd. Marcos Veiga dos Santos.

1. Infecção intramamária. 2. Produção e composição do leite. 3. Espectrometria de massas. 4. Identificação microbiológica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por estafilococos coagulase-negativa", protocolado sob o nº 2237/2011, utilizando 1250 (hum mil duzentos e cinquenta) amostras de leite de vaca, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Production and composition in dairy cows with mastitis caused by coagulase negative staphylococci", protocol number 2237/2011, utilizing 1250 (one thousand, two hundred and fifty) sample milk cow, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Denise Fantoni

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TOMAZI, Tiago

Título: **Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa**

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 a duas pessoas que me fizeram homem. Almas abençoadas que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca é uma opção contínua em nossas vidas; e que sonhar e concretizar os sonhos só depende de nossa vontade. Dedico esta etapa de minha vida aos meus queridos pais.

Neuri e Eveli Tomazi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades que me tens dado de testemunhar o amor que tens por mim. Agradeço também ao Senhor pelos animais, seres divinos e frutos do meu trabalho. É em suas mãos que entrego as rédeas da minha vida meu Deus.

A minha família por jamais deixar faltar confiança, apoio, carinho, compreensão e amor. E por provar que um coração pode se sentir aquecido e amado, mesmo a quilômetros de distância.

Aos meus avós Alcides, Elvira, Alberto e Antonieta por me ensinar o "respeito", uma das virtudes mais belas de um ser humano.

Ao meu orientador Prof. Marcos Veiga dos Santos pela amizade e confiança e por todas as oportunidades, orientação e ensinamentos nesses últimos três anos.

Aos meus amigos e colegas Juliano Leonel Gonçalves e Juliana Regina Barreiro pelo apoio incondicional durante todo o desenvolvimento deste estudo. Agradeço muito a vocês pela amizade e por não medir esforços para estar ao meu lado.

A todos meus colegas e amigos do Laboratório Qualileite, Marco Aurélio Porcionato, Bruno Botaro, Cristina Cortinhas, Daniele Beuron, Nara Carvalho, Luiz Henrique, Susana Nori de Macedo, Marina Migliano, Camila Silano, Cristian Martins, Aline Dibbern, Marcos Arcari e Alessandra Orsi. Obrigado pelos bons momentos de convivência e companheirismo.

Aos especialistas do laboratório Qualileite, José Garcia Moreno e Lucinéia Mestieri, pessoas fundamentais nas análises laboratoriais. Obrigado pela paciência, amizade, carinho e confiança.

A minha amiga e colega Lígia Mesquita por toda a paciência e auxílio na execução das análises de biologia molecular.

Ao prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin e todos os colegas do Laboratório ThoMSon (UNICAMP), em especial, à Christina, Vanessa, Alessandra e Patrícia, pela disponibilidade e parceria.

A todos os produtores de leite pela luta e esforço diário na atividade leiteira, e por abriram as porteiras de suas fazendas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial, Luis Felipe Prada e Silva, Francisco Palma Rennó e Augusto Gameiro pela amizade e por nunca hesitarem em compartilhar seus conhecimentos.

Aos meus amigos de Veranópolis, RS que demonstraram que a distância jamais será uma barreira para uma amizade sincera.

A todos meus amigos de Pirassununga pelos momentos de diversão, lazer, amizade e confidências. Em especial ao Rodrigo Gardinal, Gustavo Delfino Calomeni, Alejandro, Jotta Kazu, Caio, José Esler, Thiago Centini e Elmeson. A vocês meus amigos, meu muito obrigado!

Aos meus também irmãos Dannylo Oliveira, Rodrigo Gardinal, Gustavo Calomeni e Marina Migliano. Estes, não apenas por estarem ao meu lado nos momentos bons, mas principalmente, por dividirem fardos pesados em momentos difíceis. Obrigado sempre!

Aos meus tios Lurdes e Harold, Eli e Giuseppe e padrinhos Maristela e Libânio por nunca deixarem de acreditar em mim e por todo amor e carinho. Vocês são pilares de sustentação da minha vida e realidade profissional.

Aos meus amigos Cláudio e Lígia Calomeni por me acolherem como parte de sua família. Sou muito grato por tudo que vocês têm feito por mim.

A todos os funcionários do VNP, que dia após dia garantem o funcionamento, segurança e limpeza do departamento de pós-graduação. Em especial, ao João Paulo, Alessandra, Fábia, Alberto, Luciano, Maria, Celília e Suélen. A vocês meu sincero agradecimento.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas verbas destinadas para bolsa de mestrado e auxílio ao projeto.

A todos que aqui não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

TOMAZI, T. **Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa.** [Milk yield and composition of cows with subclinical mastitis caused by coagulase negative staphylococci]. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Staphylococcus coagulase negativa formam o grupo de agentes mais isolados de vacas com mastite em diversos países. No entanto, a grande variedade de espécies e a ausência de métodos de identificação simples e rápidos são fatores que limitam a avaliação do efeito da mastite causada por SCN sobre a produção e composição do leite. Portanto, os objetivos gerais deste estudo foram: 1) avaliar o efeito da infecção intramamária (IIM) subclínica causada por SCN sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários; 2) determinar o efeito da IIM causada por SCN sobre a composição do leite e contagem de células somáticas (CCS); 3) avaliar a técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS) para a identificação das espécies de SCN isoladas de vacas com mastite; 4) avaliar a frequência de espécies de SCN isoladas de vacas com mastite subclínica. Amostras compostas de leite foram coletadas de 1.242 vacas pertencentes a 21 rebanhos leiteiros. As coletas foram realizadas em duas etapas: na primeira, realizou-se coleta asséptica de amostras compostas para identificação dos agentes causadores de mastite; e na segunda, para as vacas com isolamento de SCN, a produção de leite foi mensurada e amostras de leite foram coletadas por quarto mamário para confirmação do diagnóstico microbiológico (SCN) e avaliação da composição e CCS. Os isolados de SCN foram diferenciados genotipicamente pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (RFLP) e por MALDI-TOF MS. Treze cepas de referência de espécies de SCN normalmente isoladas da mastite foram utilizadas como controle positivo para as duas metodologias de identificação. Um total de 108 quartos mamários foram identificados em nível de espécie pela técnica de PCR-RFLP. Destes, foram selecionados 41 pares de quartos mamários contralaterais com e sem IIM causada por SCN para avaliação do efeito de SCN sobre a produção e composição do leite. Quartos mamários com IIM causada por SCN apresentaram maior CCS (496,99 x 10^3 células/mL) que os quartos mamários contralaterais sadios (160,79 x 10^3 células/mL). A IIM causada por SCN não afetou a produção de leite e as concentrações de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco

desengordurado. Do total de amostras identificadas em nível de espécie pela técnica de PCR-RFLP (n=108), 103 (95,37%) foram identificadas pela MALDI-TOF MS em nível de espécie. Cinco isolados de SCN apresentaram identificação em nível de gênero (*Staphylococcus* spp.) pela MALDI-TOF MS. Todas as cepas de referência foram corretamente identificadas por ambas as metodologias de identificação. *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie mais prevalente (n=80; 74,07%) em vacas com mastite, seguida de *S. saprophyticus* (n=6; 5,55%) e *S. haemolyticus* (n=5; 4,63%). Em conclusão, a IIM subclínica causada por SCN aumenta a CCS, porém não altera a produção e composição do leite. A técnica de MALDI-TOF MS é um método sensível (95,37%) e que pode ser utilizado na identificação de espécies de SCN causadoras de mastite. *Staphylococcus chromogenes* é a espécie mais prevalente em vacas com mastite subclínica causada por SCN.

Palavras-chave: Infecção intramamária. Produção e composição do leite. Espectrometria de massas. Identificação microbiológica.

ABSTRACT

TOMAZI, T. **Milk yield and composition of cows with subclinical mastitis caused by coagulase negative staphylococci. [**Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase negativa.]. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Coagulase negative staphylococci (CNS) are the most isolated group of mastitis pathogens in many countries. However, the diversity of species and the absence of a simple and fast identification method are limiting factors for the evaluation of the effect of CNS mastitis effect on milk yield and composition of dairy cows. Therefore, the main objectives of this study were: 1) to evaluate the effect of subclinical intramammary infection (IMI) caused by CNS on milk yield and composition at mammary quarter level; 2) to determine the effect of IMI caused by CNS on the milk composition and somatic cell count (SCC); 3) to evaluate the technique of matrix-assisted laser desorption ionization - time-of-flight - mass spectrometry (MALDI/TOF-MS) for species identification of CNS isolated from mammary glands; 4) to evaluate the frequency of CNS species isolated from cows with subclinical mastitis. Milk samples were collected from 1,242 cows distributed in 21 dairy herds. Milk samples were collected in two visits to the farm: first, composite milk samples were aseptically collected for identification of mastitis causative pathogens; and the second, the milk yield was measured and milk samples were collected at mammary quarter level for cows with isolation of CNS to confirm the diagnosis and for analysis of milk composition and SCC. Isolates of CNS were genotypically differentiated by polymerase chain reaction (PCR) associated with restriction fragment length polymorphism assays and by MALDI-TOF MS. Thirteen CNS reference strains commonly isolated from mastitis were used as positive controls for the two identification methods. A total of 108 mammary quarters were genotipically identified by PCR-RFLP. Of these, 41 pairs of contralateral mammary quarters both with and without IIM caused by SCN were evaluated. Mammary quarters infected with CNS presented higher SCC (496.99 x 10^3 cells / mL) than contralateral healthy mammary quarters (160.79 x 10^3 cells / mL). Intramammary infection caused by CNS did not affect the milk yield and the concentrations of fat, protein, casein, lactose, total solids and solids not fat. Of the 108 samples identified by PCR-RFLP, 103 (95.37%) were also identified by MALDI-TOF MS with to the species level. Five CNS had reliable identification at genus level (*Staphylococcus* spp.). All the reference strains were correctly identified by both identification methods. The

most prevalent species isolated from samples collected from cows with mastitis were *Staphylococcus chromogenes* (n = 80, 74.07%), followed by *S. saprophyticus* (n = 6, 5.55%) and *S. haemolyticus* (n = 5, 4.63%). In conclusion, subclinical mastitis caused by CNS increases the SCC, but do not affect the milk yield and composition. The MALDI-TOF MS is a sensitive method (95.37%) that can be used for the identification of CNS species causing mastitis. *Staphylococcus chromogenes* is the most prevalent CNS species isolated in the samples collected from cows with subclinical mastitis.

Keywords: Intramammary infection. Milk yield and composition. Mass spectrometry. Microbiological identification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectros de MALDI-TOF MS das proteínas ribossomais das cepas de referência (ATCC) utilizadas no estudo. 66

Figura 2 - Fluxo de coleta de amostras compostas e por quartos mamários para isolamento de SCN, composição e CCS. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolamento de agentes etiológicos da mastite em amostras compostas e por quartos mamários bovinos 64

Tabela 2 - Identificação de isolados de Staphylococcus spp. por PCR-RFLP versus MALDI-TOF MS..... 68

Tabela 3 - Efeito da infecção intramamária causada por SCN sobre a produção, composição e a CCS do leite de quartos mamários..... 86

Tabela 4 - Efeito da IIM causada por SCN sobre a produção, composição e CCS no leite de quartos mamários contralaterais. 87

Tabela 5 - Produção, composição do leite e CCS, por espécies de SCN identificadas pela metodologia de PCR-RFLP..... 89

Tabela 6 - Efeito da IIM causada por *Staphylococcus chromogenes* sobre a produção, composição e CCS do leite de quartos mamários contralaterais. 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain heart infusion
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Peterson
CAS	Caseína
CCS	Contagem de células somáticas
cfu	Unidade formadora de colônia
CIM	Concentração inibitória mínima
CMT	Califórnia mastites test
CS	Células somáticas
D	Densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão de media
ES	Extrato seco
ESD	Extrato seco desengordurado
EUA	Estados Unidos da América
G	Gordura
GLC	Cromatografia líquida-gasosa
h	Horas
IIM	Infeção intramamária
ISO; IDF	International Organization for Standardization & Dairy Federation, International /Standard
Kg	Kilogramas
m/z	Relação massa/carga
MALDI/TOF-MS	Espectrometria de massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
min	Minutos
mL	Mililítro
mm	Milímetros
mM	Milimol
MS	Espectrometria de massas
n	Número de observações
ng	Nanograma
NMC	National mastitis council
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLC	Produção de leite corrigida
p/v	Relação peso/volume
SCN	*Staphylococcus* coagulase negativa
SCP	*Staphylococcus* coagulase positiva
SeqGEN	Sequenciamento de genes 16S rRNA
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TNF-α	Fator tumoral de necrose
TSA	Ágar tríptico de soja
TSB	Caldo de tripcase soja
µL	Microlítro
µg	Micrograma
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1 CONCEITOS SOBRE A MASTITE 20
2.2 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS* 23
2.2.1 Classificação de *Staphylococcus* spp. no diagnóstico da mastite 24
2.3 *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA COMO AGENTE CAUSADOR DA MASTITE 25
2.3.1 Prevalência do SCN em infecções intramamárias 26
2.3.2 Prevalência de IIM causadas por SCN em vacas primíparas 29
2.3.3 Sinais clínicos da mastite causada por SCN 30
2.3.4 Fatores de virulência associados ao SCN 32
2.3.5 Efeito da mastite causada por SCN sobre a produção de leite 33
2.3.6 Efeito da mastite causada por SCN sobre a CCS 35
2.3.7 Efeito protetor dos SCN sobre infecções intramamárias causadas por patógenos primários 37
2.4 ESPÉCIES DE SCN RELACIONADAS COM IIM 38
2.4.1 Epidemiologia das IIM causadas por SCN 38
2.4.2 Persistência da mastite causada por SCN 42
2.5 TRATAMENTO DA MASTITE CAUSADA POR SCN 43
2.5.1 Uso de antimicrobianos para o tratamento de IIM causadas por SCN 43
2.5.2 Prevenção da mastite causada por SCN 45
2.6 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SCN 47
2.6.1 Métodos fenotípicos e genotípicos 47
2.6.2 Identificação de SCN por espectrometria de massas 50
3 IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE VACAS COM MASTITE POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS 53
3.1 INTRODUÇÃO 54
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 56
3.3 Resultados 62
3.4 DISCUSSÃO 71
3.5 CONCLUSÃO 76

4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS COM MASTITE CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA 77
4.1 INTRODUÇÃO 78
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 80
4.3 RESULTADOS 84
4.4 DISCUSSÃO 90
4.5 CONCLUSÃO 95
5 CONCLUSÕES GERAIS 96
REFERÊNCIAS 97

1 INTRODUÇÃO

A mastite, especialmente em sua forma subclínica, é a doença que mais causa prejuízos na bovinocultura leiteira, pois afeta a produção e a qualidade do leite, além de reduzir o rendimento industrial dos derivados lácteos. Patógenos secundários que afetam a glândula mamária, em especial, *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) se tornaram os agentes causadores de mastite mais predominantes em rebanhos leiteiros (SAMPIMON et al., 2010). Atualmente, em países nos quais os patógenos primários da mastite (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e coliformes) estão controlados, SCN têm se tornado microrganismos emergentes e importantes na etiologia da mastite subclínica (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

Dezesseis espécies de SCN já foram isoladas de amostras de leite de vacas com mastite (CAPURRO et al., 2009) e ainda que sejam considerados patógenos secundários, são altamente prevalentes em rebanhos leiteiros. O efeito da mastite causada por SCN sobre a produção de leite e sanidade da glândula mamária permanece inconclusivo. Estudos classificaram SCN como causa importante da mastite bovina, com potencial em causar redução na produção de leite (GRÖHN et al., 2004). Contrariamente, outros estudos classificaram tais microrganismos como patógenos secundários do úbere, com impacto limitado sobre a produção e contagem de células somáticas (CCS) do leite (PARADIS et al., 2010). Recentemente, estudos sugerem efeito protetor destes microrganismos sobre a glândula mamária frente a agentes primários causadores de mastite, com inclusive, aumentos na produção leiteira (REYHER et al., 2012).

O efeito de patógenos causadores de mastite sobre a redução nos componentes e produção de leite pode ser subestimada quando vacas infectadas são comparadas com grupos de vacas sadias e não com sua potencial produção antecedente à infecção (PYÖRALA; TAPONEN, 2009). Além disso, um estudo sugeriu que vacas de alta produção podem ser mais predispostas a desenvolverem mastite causada por SCN (GRÖHN et al., 2004). Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram o efeito da IIM causada por SCN sobre a produção e composição do leite por meio da comparação de quartos contralaterais sadios e infectados. Este método comparativo pode minimizar a variação que ocorre entre os quartos mamários e que podem ser fatores de confundimento, tais como, sistemas de manejo e desafio ambiental.

Espécies de SCN como *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus epidermidis* apresentaram maior afinidade pela glândula mamária, com características de patógenos verdadeiros do úbere, enquanto outras espécies parecem apresentar características de microrganismos ambientais (PIESSENS et al., 2011). Adicionalmente, *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* apresentaram CCS similares à observada em infecções intramamárias (IIM) causadas por *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). A grande heterogeneidade epidemiológica entre as espécies de SCN denota a importância de identificação microbiológica deste grupo de bactérias em nível de espécie.

A identificação em nível de espécie pode caracterizar as potenciais diferenças epidemiológicas inerentes aos SCN, porém o desenvolvimento de uma técnica rápida e precisa tem sido um desafio ainda não superado. Métodos fenotípicos como os painéis bioquímicos convencionais são caros e/ou demorados e não apresentaram precisão no diagnóstico de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras coletadas de animais (BES et al., 2000). O uso de técnicas de biologia molecular oferecem vantagens devido à rapidez no diagnóstico e especificidade (BRITTEN, 2012), porém, não existe uma metodologia padrão, amplamente aceita, para a identificação de espécies de SCN por meio de padrões genotípicos. Desta forma, os programas de diagnóstico da mastite ainda carecem de uma metodologia rápida e que de forma confiável discrimine entre as espécies de SCN isoladas da mastite.

A metodologia de dessorção a laser assistida por matriz, seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS) é uma técnica que se baseia na diferenciação dos perfis proteicos dos microrganismos e tem sido utilizada no diagnóstico clínico de espécies de SCN em medicina humana (BENAGLI et al., 2011). Apenas um estudo avaliou a identificação de microrganismos causadores de mastite pela técnica de MALDI-TOF MS (BARREIRO et al., 2010). No entanto, o estudo anterior foi realizado com limitado número de amostras e não teve como objetivo a identificação de espécies de SCN causadores de mastite. De acordo com Barreiro et al. (2010), a técnica de MALDI-TOF MS pode tornar o diagnóstico da mastite mais rápido, preciso e espécie-específico. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a técnica de MALDI-TOF MS para o diagnóstico de SCN causadores de mastite bovina em nível de espécie.

Desta forma, os objetivos gerais do presente estudo foram: 1) avaliar o efeito da mastite subclínica causadas por espécies de SCN sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários bovinos; 2) determinar o efeito de IIM causadas por espécies de SCN sobre as concentrações de gordura, proteína bruta, caseína, lactose, extrato seco total, extrato seco

desengordurado do leite e CCS; 3) avaliar a técnica de MALDI-TOF MS para a identificação das espécies de SCN isoladas de quartos mamários; 4) determinar a frequência de isolamento de espécies de SCN em vacas com mastite subclínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITOS SOBRE A MASTITE

A mastite é a inflamação da glândula mamária que pode ter etiologia infecciosa e não infecciosa, e é caracterizada por alterações físicas, químicas e normalmente microbiológicas do leite, bem como alterações no tecido secretor de leite (BRADLEY, 2002). A resposta inflamatória desencadeada pelo processo infeccioso tem por objetivo a eliminação do microrganismo causador, a neutralização de toxinas e a regeneração dos tecidos danificados (SANTOS; FONSECA, 2006). As principais causas infecciosas da mastite são bactérias, fungos, leveduras e algas.

O processo de infecção intramamária (IIM) é iniciado quando microrganismos invadem a glândula mamária pelo canal do teto e multiplicam-se no interior dos tecidos mamários. Após invasão da glândula mamária, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, com o objetivo de eliminar o agente infeccioso e alterações da permeabilidade vascular e outros sinais da inflamação (SANTOS; FONSECA, 2006). A mastite infecciosa pode levar à redução na produção de leite devido à lesão ocorrida no tecido glandular, alterações na composição do leite e ao aumento na contagem de células somáticas (CCS) (HARMON, 1994).

A mastite bovina é a doença mais importante da produção leiteira e apresenta grande influência sobre a lucratividade dos produtores e de toda cadeia agroindustrial do leite. A mastite resulta em perdas econômicas significativas que estão associadas com redução na produção de leite (mais de 70%), custo com tratamento e serviços médico veterinários (7%), descarte de leite durante o período de tratamento (9%), aumento da mão-de-obra (1%) e descarte prematuro de animais (14%) (MILLER et al., 1993; SHARMA et al., 2012).

A maior parte dos casos de mastite bovina é de etiologia bacteriana e, em aproximadamente 80% deles, cinco espécies (*Escherichia coli, Streptococcus uberis, Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalatiae* e *Streptococcus agalactiae)* são responsáveis pelo estabelecimento da enfermidade (BRADLEY, 2002). Uma vez acometido, o quarto mamário com mastite pode evoluir para cura espontânea ou, na maioria das vezes, para um quadro crônico, tornando-se necessária a identificação do agente causador para adequar as medidas de controle e tratamento (OLIVER et al., 2004).

Infecções intramamárias podem apresentar-se sob a forma clínica com sinais evidentes de inflamação da glândula mamária tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor, aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (BRADLEY, 2002). A mastite clínica pode ainda ser acompanhada por sintomas sistêmicos, como aumento da temperatura corporal, depressão, desidratação, diminuição do consumo de alimentos e redução da produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2006).

Entretanto, é a forma subclínica que mais causa prejuízos à indústria leiteira, a qual causa redução da produção de leite e afeta diretamente o produtor, os laticínios e o consumidor (SANTOS; FONSECA, 2006). Na forma subclínica não há mudanças visíveis nas características do leite ou do úbere, porém, redução de produção de leite e alteração da composição, como diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio e aumento de CCS e dos teores de proteínas séricas são normalmente observados (CHANG et al., 2004). Estes fatores determinam a diminuição do rendimento industrial dos derivados, e o tempo de prateleira do produto (BRADLEY, 2002).

Em relação ao agente infeccioso, a mastite pode ser classificada como ambiental ou contagiosa (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Os patógenos contagiosos da mastite podem ser considerados microrganismos adaptados ao hospedeiro, pois dependem da glândula mamária para sua sobrevivência e multiplicação. Os microrganismos contagiosos têm potencial de estabelecer IIM subclínicas, as quais tipicamente se manifestam por aumentos na CCS do leite dos quartos afetados. A transmissão dos patógenos contagiosos normalmente ocorre de vaca para vaca, ou de um teto lesionado para uma vaca sadia por meio das mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha ou toalhas de uso comum (BRADLEY, 2002).

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* são considerados os principais agentes contagiosos e são responsáveis por redução da produção e da qualidade do leite em rebanhos leiteiros (KEEFE, G., 2012). *S. agalactiae* é considerado patógeno obrigatório da glândula mamária bovina (KEEFE, G. P., 1997), enquanto que o *S. aureus*, apesar de ter a glândula mamária como reservatório primário, já foi isolado da superfície da pele, narinas e vulva, podendo também ser isolado do ambiente (ROBERSON et al., 1994). Um estudo realizado na Noruega relatou que o jarrete das vacas é um local comum de colonização de *S. aureus* e que sua proximidade com os tetos quando as vacas estão deitadas poderia aumentar o risco de transmissão de novas IIM (CAPURRO et al., 2010).

Em contraste, os patógenos ambientais são descritos como invasores oportunistas da glândula mamária. Normalmente, os patógenos ambientais invadem a glândula mamária, multiplicam-se, desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro e são rapidamente

eliminados (BRADLEY, 2002). Os principais patógenos ambientais da mastite podem ser tanto bactérias gram-positivas (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*), quanto bactérias gram-negativas (*Escherischia coli* e *Klebsiella* spp.) (RUEGG, 2012). A duração de IIM causada por patógenos ambientais varia entre os microrganismos causadores (SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985) e pode ser associada com o grau de adaptação ao hospedeiro. Alguns patógenos ambientais, como a *E. coli* são totalmente oportunistas e a resposta imune da vaca normalmente elimina estes patógenos após um breve período de quadro clínico moderado (RUEGG, 2012). Atualmente, outros patógenos ambientais causadores de IIM como *Streptococcus uberis* ou *Klebsiella* spp., podem estar mais adaptados ao hospedeiro. Estes agentes podem causar casos clínicos leves que posteriormente aparentam estar curados, porém apenas retornaram para a forma subclínica (RUEGG, 2012).

A classificação de patógenos contagiosos ou ambientais se difundiu antes do surgimento das metodologias de identificação molecular de microrganismos. O uso de *fingerprintings* de DNA e outras metodologias moleculares demonstraram resultados controversos quanto a classificação da mastite pelo comportamento ambiental ou contagioso dos microrganismos (RUEGG, 2012). Alguns estudos relataram grande diversidade genotípica de cepas supostamente de patógenos contagiosos isoladas de amostras de leite entre as fazendas (OLIVEIRA, L. et al., 2011). Da mesma forma, foi relatada a ocorrência de patógenos ambientais gram-negativos adaptados ao hospedeiro (MUNOZ et al., 2007; ZADOKS et al., 2011).

Ao passo que as metodologias de biologia molecular se tornam mais comuns em laboratórios de diagnóstico, é provável que o entendimento quanto às formas de infecção e transmissão da mastite seja aperfeiçoado. Segundo Ruegg (2012), em um futuro próximo, os programas preventivos da mastite serão focados em rotas múltiplas de transmissão independentemente da classificação dos patógenos. Ao se deparar com um problema de mastite, os veterinários terão de usar seus conhecimentos epidemiológicos para investigar fatores de risco de transmissão em cada fazenda, sem necessariamente utilizar a classificação tradicional relacionada com as rotas de transmissão contagiosa ou ambiental.

2.2 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Os *Staphylococcus* são membros da família Staphylococcaceae. Morfologicamente são caracterizados como cocos Gram-positivos, com 0,5 – 1,5 µm de diâmetro. Podem ocorrer de forma isolada, em pares, tétrades, pequenas cadeias (três a quatro células) ou irregulares, como cachos de uva. São microrganismos imóveis, catalase-positiva (com exceção de *S. aureus* subsp. *anaerobius*), resistentes à bacitracina, não esporulados e anaeróbios facultativos. As colônias geralmente são opacas e podem ser brancas ou cremes e algumas vezes amarelas. Geralmente, crescem em meios contendo NaCl a 10% e a temperatura ótima de crescimento se encontra entre 30°C e 37°C (HOLT et al., 1994; BANNERMAN, 2003).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são microrganismos comensais em seres humanos, que podem causar infecções graves, comuns em hospitais (BENNETT; BRACHMAN, 1998). Nos animais, *Staphylococcus* são causa importante de infecções, podendo ser isolado em quadros infecciosos ou não de mamíferos e aves.

O nome *Staphylococcus* foi usado pela primeira vez em 1884 pelo físico e microbiologista Friedrich Julius Rosenbach. Esta denominação foi usada para microrganismos presentes no pus e a diferenciação entre algumas espécies conhecidas de estafilococos foi realizada com base na coloração das colônias. Os *Staphylococcus* com coloração amarelo-alaranjado foram identificados como *S. aureus*, enquanto que os *Staphylococcus* com colônias de coloração branca foram chamados de *S. albus*. Posteriormente, o *S. albus foi* identificado como *S. epidermidis*, o qual foi presumivelmente considerado comensal. Em 1882, um estudo relatou a presença de *Staphylococcus* spp. na pele de humanos e a comensalidade desses microrganismos foi questionada (KLOOS; SCHLEIFER, 1975). Posteriormente, a identificação das espécies pela coloração das colônias provou ser insatisfatória.

O progresso na taxonomia e a descoberta das propriedades fenotípicas úteis para classificação do gênero *Staphylococcus* foi lenta. A correlação das espécies com distinção pela reação de coagulase só foi realizada a partir de 1930, o que permitiu identificar a patogenicidade das espécies. A partir da prova de coagulase, dois novos grupos foram formados, o *Staphylococcus* coagulase positivo considerado patogênico e o *Staphylococcus* coagulase negativo considerado não-patogênico. Durante a década de 60, Baird-Parker conduziu um dos estudos taxonômicos mais compreensivos sobre o gênero *Staphylococcus* e propôs uma subdivisão em subgrupos I-VI (BAIRD-PARKER, 1963). O subgrupo I continha a espécie *S. aureus*, e os subgrupos II-VI eram tipos distinguíveis de SCN. Após, os

subgrupos II-VI foram incluídos em um único grupo chamado *S. epidermidis* e os subgrupos foram alterados para biotipos.

A organização em biotipos e uma nova série de estudos com foco em diferentes populações de estafilococos adaptadas ao hospedeiro nas décadas de 70 e 80 permitiram a identificação de novas espécies e subespécies (KLOOS; SCHLEIFER, 1975; DEVRIESE et al., 1978; SCHLEIFER; KILPPERBALZ; DEVRIESE, 1984; DEVRIESE et al., 1985).

As conclusões de estudos sobre a etiologia das IIM causadas por SCN realizadas antes dos anos 80 devem ser consideradas com certa cautela devido ao fato de *S. epidermidis* ser classificado como um grupo neste período, o qual posteriormente passou a ser um nome de espécie. A espécie *S. hyicus* também pode ter sido identificada erroneamente em estudos prévios, já que o *S. chromogenes*, uma das espécies de SCN com maior prevalência nos dias atuais, foi identificado como uma subespécie de *S. hyicus* até 1987 (HAJEK et al., 1986).

2.2.1 Classificação de *Staphylococcus* spp. para o diagnóstico da mastite

No diagnostico da mastite, os *Staphylococcus* são divididos em coagulase-positiva e coagulase-negativa com base na capacidade de coagular o plasma de coelho (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999). Um dos principais patógenos primários, o *S. aureus*, é classificado como coagulase-positivo, apesar de algumas cepas terem sido sugeridas como coagulase-negativa em alguns estudos (FOX; BESSER; JACKSON, 1996). Algumas outras espécies de *Staphylococcus* podem ser coagulase-positiva, como o *S. hyicus* e *S.intermedius* (HAJEK, 1976; DEVRIESE et al., 1978; DEVRIESE et al., 2005), porém para o diagnóstico da mastite todos os isolados de *Staphylococcus* coagulase-positiva são normalmente classificados como *S. aureus*, enquanto o restante dos isolados, com reação negativa na prova de coagulase, é identificado como SCN. No diagnóstico da mastite bovina esta classificação tem sido considerada adequada, pois o SCN normalmente causa mastite subclínica ou somente mastite clínica moderada, e são tradicionalmente reconhecidos como patógenos secundários de menor importância.

2.3 *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA COMO AGENTE CAUSADOR DA MASTITE

Staphylococcus coagulase negativa constituem um grupo de microrganismos bacterianos que compõe a maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* e são responsáveis por infecções oportunistas em seres humanos e em animais (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Segundo Taponen (2008), quarenta espécies de *Staphylococcus* já foram identificadas, dez possuem subespécies, o que totaliza 52 espécies e subespécies. Os estafilococos são encontrados na microbiota de mamíferos e são frequentemente isolados da boca, superfície cutânea, glândulas mamárias, intestino, trato geniturinário e trato respiratório superior (KLOOS; LAMBE, 1991).

Por décadas o gênero *Staphylococcus* tem sido causa dominante da mastite, em especial, a espécie *Staphylococcus aureus*, amplamente descrita em estudos anteriores (SEARS; MCCARTHY, 2003; BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). Atualmente, em países onde os agentes primários da mastite (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e agentes ambientais) já foram controlados em decorrência de programas específicos de controle e prevenção desta doença, SCN têm se tornado microrganismos emergentes e importantes causadores de IIM (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). *Staphylococcus* coagulase negativa é considerado um grupo de agentes secundários da mastite que normalmente causam infecções intramamárias subclínicas com aumento moderado de CCS. A alta prevalência destes agentes em rebanhos leiteiros tem despertado o interesse em práticas de controle e tratamento, principalmente em rebanhos de média CCS (SAMPIMON, O. et al., 2010; SUPRÉ et al., 2011).

Ainda que sejam considerados agentes secundários da mastite bovina e com moderadas alterações da CCS e composição do leite, SCN são altamente prevalentes nos rebanhos leiteiros. No entanto, os resultados do efeito destes agentes sobre a saúde da glândula mamária são ainda inconclusivos. Alguns estudos relataram SCN como causa importante da mastite bovina e com redução na produção de leite (TIMMS; SCHULTZ, 1987; GROHN et al., 2004). Por outro lado, outros estudos classificaram tais microrganismos como patógenos secundários do úbere, com impacto limitado na produção e qualidade do leite (SCHUKKEN, Y. H. et al., 2009). Além disso, alguns estudos sugeriram efeito protetor destes microrganismos na glândula mamária frente a agentes primários causadores de mastite, com inclusive, aumentos na produção leiteira (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997; REYHER et

al., 2012) A etiologia da mastite causada por SCN ainda não está bem elucidada, e isso pode ser, em parte, explicado pela heterogeneidade de espécies presentes neste grupo de bactérias.

2.3.1 Prevalência do SCN em infecções intramamárias

Vários estudos descreveram SCN como os microrganismos mais comumente isolados de amostras de leite (PITKALA et al., 2004; TENHAGEN et al., 2006; PIEPERS et al., 2007; SAMPIMON, O. C. et al., 2009; SAMPIMON, O. et al., 2010). A alta prevalência de SCN indica a importância destes patógenos na etiologia da mastite de vacas leiteiras. Os SCN são mais frequentemente isolados de quartos com mastite subclínica ou clínica com sinais moderados de inflamação e alteração da composição e consistência do leite.

A prevalência de mastite causada por SCN varia marcadamente entre estudos. Esta variação se deve, em parte, a diferenças nos procedimentos de amostragem e diagnóstico, o que torna difícil a comparação entre os estudos disponíveis na literatura. Outros fatores de importância são o número de partos e estágio de lactação. Alguns estudos sugerem que a maior prevalência de IIM causada por SCN ocorre em primíparas durante o periparto (OLIVER; SORDILLO, 1988; WHITE et al., 1989; FOX et al., 1995). Os sistemas de instalações e criação e o nível de produção também podem ser fatores de importância para a etiologia e prevalência de SCN em rebanhos leiteiros. Novilhas em pastagens apresentaram baixa prevalência de IIM causadas por SCN (COMPTON et al., 2007), e vacas com alta produção de leite apresentaram maior predisposição à IIM causadas por esses agentes (GROHN et al., 2004).

De acordo com a meta-análise realizada por Djabri et al. (2002), a prevalência de IIM causada por SCN pode variar de 5,5 a 27,1% em nível de quarto mamário. Em dois estudos realizados na Suíça e Estônia, ambos abrangendo elevado número de rebanhos, a prevalência de IIM causadas por SCN foi de 8,3% em nível de vaca (aproximadamente 3,5% dos quartos mamários) (ROESCH et al., 2007) e 4,5% em nível de quarto mamário (HALTIA et al., 2006), respectivamente.

Em estudo realizado na Finlândia, SCN foram isolados de 17% dos quartos mamários e em 50% dos quartos com crescimento bacteriano (PITKALA et al., 2004). Com base em um mesmo delineamento experimental, SCN foram isolados de 3% de todos os quartos mamários

e de 14% dos quartos com crescimento bacteriano (OSTERAS; SOLVEROD; REKSEN, 2006). Na Alemanha, SCN foram isolados de 9% dos quartos mamários de um total de 80 rebanhos leiteiros, os quais foram responsáveis por 35% das amostras com crescimento bacteriano provindos de casos de mastite subclínica (TENHAGEN et al., 2006). Em estudo conduzido na Holanda, 10% dos quartos mamários de vacas com baixa CCS e 15% dos quartos de um grupo de alta CCS apresentaram isolamento de SCN nas amostras de leite (SAMPIMON, O. C. et al., 2009). Menor taxa de prevalência foi relatada em estudo realizado na Bélgica, em que 154 de 2.580 quartos mamários (6%) apresentaram cultura positiva para SCN (PIESSENS et al., 2011).

Schukken et al. (2009), com base em 352.614 registros de 4.200 rebanhos provindos de estudos de campo, observaram que aproximadamente 9% de todas vacas estavam infectadas com SCN. Em nível de rebanho, a prevalência média de IIM causadas por SCN foi de 15% das vacas amostradas. Em outro estudo, com base em 11 rebanhos da Suécia, 2.303 amostras de quartos mamários de 587 vacas foram coletadas em duas etapas. No total foram identificadas 277 amostras com SCN na primeira amostragem e 251 amostras na segunda, o que correspondeu a uma prevalência de isolamento de SCN de 12 e 11% em nível de quarto mamário, respectivamente (THORBERG et al., 2009).

Dufour et al. (2012) avaliaram a epidemiologia de IIM causadas por espécies de SCN e o efeito de falhas na identificação das culturas microbiológicas em relação à definição de IIM. Após ajuste dos erros de identificação, avaliados por questionários e observação em nível de fazenda, a prevalência verdadeira de IIM causada por SCN foi de 42,7% das amostras com identificação microbiológica. Quando o erro de identificação de IIM foi ignorado, observou-se prevalência de 60,8%. Ao ignorar o erro de classificação de IIM, uma superestimação da prevalência de IIM causada por SCN foi observada.

Infecções intramamárias causadas por SCN também são comuns nos EUA e Canadá. Em estudo que abrangeu os dois países, 15% das novas IIM diagnosticadas no período pós-parto foram causadas por SCN (DINGWELL et al., 2004). Em dois rebanhos leiteiros experimentais em Ontário, Canadá, SCN foram os agentes mais isolados (51%) de IIM na secagem de vacas (LIM et al., 2007). Em Wisconsin, EUA, SCN foi isolado de 13% das amostras de leite submetidas ao exame microbiológico e foi o grupo de bactérias mais isolado neste estudo com 24% das amostras positivas no crescimento bacteriano (MAKOVEC; RUEGG, 2003). Em outro estudo realizado no mesmo estado americano com 20 fazendas convencionais e outras 20 produtoras de leite orgânico, a prevalência de IIM causada por SCN

foi de 14% (38% do crescimento bacteriano) e 17% (30% do crescimento bacteriano), respectivamente (POL; RUEGG, 2007).

Estudos realizados no Brasil também relataram alta prevalência de SCN nos rebanhos leiteiros. Souto et al. (2010) relatou uma frequência de isolamento de 9,52% (n=444) das amostras coletadas de 4.662 quartos mamários (1.180 vacas) de 36 rebanhos do estado de São Paulo. Em outro estudo, exames microbiológicos foram realizados a partir de 6.315 amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários de 1.609 vacas em lactação (BRITO et al., 1999). *Staphylococcus* coagulase negativa foi o terceiro grupo de agentes com maior frequência de isolamento com 12,4% das amostras com isolamento positivo, atrás de *Corynebacterium* spp. (55,2%) e *Staphylococcus aureus* (19,2%). Andrade et al. (1998) a partir da análise de amostras compostas de 942 vacas de 25 propriedades leiteiras do Brasil relataram prevalência de SCN de 11,6% (n=112). Em outro estudo brasileiro, de um total de 184 glândulas mamárias avaliadas em um abatedouro quanto à etiologia e histopatologia da mastite bovina, 99 (53,8%) estavam acometidas por SCN. (BENITES et al., 2002).

A proporção de SCN entre as bactérias isoladas de amostras de leite de mastite clínica é relativamente baixa. E um estudo realizado no Canadá, SCN não apareceu na lista dos agentes causadores de mastite clínica (BARKEMA; OLDE RJEKERINK, 2006). Poucos estudos relataram separadamente a proporção de SCN como causa de mastite clínica. No estudo realizado por Piessens et al. (2011), 7,5% dos casos clínicos (7 de 94 quartos amostrados) foram positivos para crescimento de SCN. Na Suécia, SCN representa somente 6% das bactérias isoladas de casos de mastite clínica (EKMAN; OSTERAS, 2004). Na Suíça os casos de mastite clínica representaram 17% (SCHÄLLIBAUM, 2001) e em Israel 9% (SHPIGEL et al., 1998). Em um estudo Norueguês realizado por, SCN foram causadores de 13% de mastite com sinais clínicos em novilhas no período de 14 dias antes e depois do parto (WAAGE et al., 2000). Na Nova Zelândia, 8% dos isolados de mastite clínica foram causados por SCN (MCDOUGALL et al., 2007). Resultados de alta prevalência de casos clínicos também foram relatados. Estudo relatou que 51% dos quartos mamários com isolamento de IIM causadas por SCN apresentaram sinais clínicos leves (49% em vacas primíparas e 53% em multíparas) (TAPONEN et al., 2006).

2.3.2 Prevalência de IIM causadas por SCN em vacas primíparas

Vacas primíparas apresentam maior prevalência de mastite causada por SCN que vacas com mais lactações (MATTHEWS; HARMON; LANGLOIS, 1992; TENHAGEN et al., 2006). Novilhas durante o período antecedente ao parto não podem ser consideradas livres de IIM. Estudos conduzidos a partir da década de 80 demonstraram que vacas primíparas poderiam apresentar IIM antes, no momento ou logo após o parto (OLIVER; MITCHELL, 1983). A maioria das IIM relatadas por Oliver e Mitchell (1983) teve como causa SCN. A prevalência de IIM causadas por SCN no período pré-parto de novilhas que não tiveram contato com o manejo de ordenha sugere que existem outras fontes de infecção além do equipamento e manejo de ordenha.

Staphylococcus coagulase negativa podem colonizar a glândula mamária de novilhas prenhes (WHITE et al., 1989; MYLLYS, 1995), e já foram isolados de glândula mamária e esfíncter de tetos de novilhas com menos de 10 meses de idade (BODDIE et al., 1987; DE VLIEGHER et al., 2003). Em sistemas intensivos de criação, a prevalência de quartos de novilhas infectadas no período pré-parto com SCN pode exceder 50% (TRINIDAD; NICKERSON; ADKINSON, 1990; OLIVEIRA, M. et al., 2006). Já em sistemas de criação com manejo de pastagem a prevalência parece ser mais baixa. Quartos mamários de vacas com acesso a pastagens durante o período de amostragem apresentaram menor probabilidade de nova IIM causada por SCN quando comparados com quartos de vacas confinadas em galpões (DUFOUR et al., 2012). Em sistemas de pastagens as condições de criação são diferentes dos sistemas de confinamento, assim, o contágio das IIM causadas por SCN em novilhas não é tão comum nestes sistemas.

Em um estudo conduzido em um rebanho experimental de Louisiana (EUA), amostras foram coletadas de 10 novilhas com aproximadamente 11 meses de idade até o parto (BODDIE et al., 1987). Resultados desse estudo indicaram que 86% das amostras de secreção mamária apresentaram isolamentos bacterianos, e 72% das bactérias isoladas foram diagnosticadas como SCN. As IIM que foram diagnosticadas no pré-parto das novilhas com 11 meses de idade podem persistir durante a lactação. Em um estudo realizado em Vermont nos EUA, 46% das novilhas e 19% dos quartos apresentaram IIM no parto (PANKEY; DRECHSLER; WILDMAN, 1991). No mesmo estudo, SCN foi a causa mais comum de IIM, sendo responsáveis por 23% da mastite nas novilhas e 11% nos quartos mamários. *Staphylococcus* coagulase negativa também foi o grupo de agentes predominante em IIM

durante o periparto de vacas primíparas e multíparas (MATTHEWS et al. (1992). A prevalência de IIM causadas por SCN em vacas primíparas no período pré-parto foi de 39%, enquanto ao parto a prevalência foi de 28%. Em vacas multíparas a prevalência foi de 50% e 12%, respectivamente.

Fox et al. (1995) avaliaram a prevalência de IIM causada por SCN em 1.583 novilhas de 28 rebanhos localizados em quatro locais dos EUA. A prevalência de IIM causada por SCN nas novilhas prenhes foi de 27%. Amostras de leite foram coletadas na primeira ordenha após o parto, e a prevalência de IIM causada por SCN foi de 22%. Os resultados sugerem que o manejo das novilhas favoreceu o desenvolvimento de IIM causadas por SCN. Em estudo realizado no Canadá, avaliou-se o efeito de IIM causadas por SCN e *S. aureus* no primeiro mês de lactação em 2.273 vacas primíparas. Aos 30 dias de parição, 24% das novilhas apresentaram ao menos uma IIM. O grupo de bactéria mais frequentemente isolada foi SCN (9,9%). *S. aureus* foi isolado em 5,3% das amostras de leite das primíparas, enquanto *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. estavam presentes em 2,4 e 2,3% das amostras, respectivamente (PARADIS et al., 2010). Na Finlândia, um estudo avaliou a mastite de novilhas antes e após o parto (MYLLYS, 1995). Infecções intramamárias causadas por SCN antes do parto foram observadas em 29% do total de 236 quartos mamários de novilhas. Do total de 74 quartos com sinais clínicos de mastite, 50% estavam com infecção causada por SCN. No período pré-parto, a prevalência de IIM causada por SCN por quarto mamário foi de 17%.

2.3.3 Sinais clínicos da mastite causada por SCN

Staphylococcus coagulase negativa são considerados patógenos secundários que infectam principalmente novilhas no periparto, não causam sinais clínicos, causam aumentos moderados na CCS, os quais desaparecem espontaneamente logo após o parto. De forma geral, sugere-se que a mastite causada por SCN resulta em sinais leves locais, como leve rubor e pouca alteração na aparência do leite, porém, são escassos estudos sobre as características clínicas da mastite ocasionada por SCN. Jarp (1991) relatou que os sintomas da mastite causada por SCN geralmente são subclínicos ou com leves sinais clínicos, apesar de sinais clínicos graves terem sido registrados. Bleul et al. (2006) relatou três casos de mastite

com sinais sistêmicos causada por outros estafilococos que não *S. aureus*. No entanto, o *status* de produção de coagulase dos agentes não foi relatado. Em um estudo realizado na Finlândia, *Staphylococcus chromogenes* foi responsável por casos de mastite clínica, porém os sinais clínicos foram 10-100 vezes menos graves que em vacas experimentalmente infectadas por *Escherichia coli* (SIMOJOKI et al., 2009).

No estudo realizado por Taponen et al. (2006), 51% dos 133 quartos com IIM causada por SCN apresentaram mastite clínica. Na maioria dos casos, a mastite foi branda, sendo que 72% dos casos apresentaram apenas alteração na aparência do leite. Aumento da temperatura corporal foi observado em apenas 7% dos casos de mastite causada por SCN. Destas, sete vacas apresentaram a temperatura corporal >39,5°C, e apenas quatro apresentaram temperatura corporal >39,9°C.

Alterações histopatológicas causadas por infecções por *Staphylococcus* spp. na glândula mamária de bovinos foram descritos em três estudos (BODDIE et al., 1987; TRINIDAD et al., 1990; BENITES et al., 2002). De acordo com os resultados, infecções por SCN causaram lesões similares, porém menos graves na glândula mamária que IIM causada por *S. aureus*. Boddie et al. (1987) observaram forte resposta leucocitária à colonização por SCN no canal do teto e tecidos mamários de duas novilhas. Trinidad et al. (1990) estudaram as alterações histopatológicas em 7 glândulas mamárias de novilhas não-prenhes infectadas experimentalmente com *S.aureus*, um quarto naturalmente infectado por *S. aureus*, e três quartos naturalmente infectados por SCN. Os quartos infectados por *S. aureus* e SCN apresentaram menores áreas alveolares, epiteliais e luminais, maiores áreas de estroma interalveolar e maior infiltração leucocitária que quartos não infectados. Quartos infectados por SCN não apresentaram alterações histopatológicas tão evidentes quanto os quartos infectados por *S. aureus.* Benites et al. (2002) avaliaram histopatologicamente vacas leiteiras descartadas devido a mastite. As alterações histopatológicas de 99 quartos infectados por SCN e 14 quartos infectados por *S. aureus* indicaram principalmente respostas inflamatórias crônicas, ou respostas inflamatórias crônicas com reparo, e nenhuma diferença histopatológica foi observada nas infecções entre SCN e *S. aureus.*

No estudo realizado por Waage et al. (1999), com base em identificação fenotípica, a proporção de mastite clínica causada por SCN foi de 13%. *S. simulans* representou 54% das espécies de SCN isoladas, seguida por *S. chromogenes* e *S. hyicus* (15% cada). *S. hyicus* foi mais associado com sinais sistêmicos que as outras espécies de SCN.

2.3.4 Fatores de virulência associados ao SCN

Poucos estudos avaliaram os fatores de virulência de SCN isolados da mastite. A aderência e a internalização do SCN nas células mamárias epiteliais foram avaliadas em estudos com cultura de células. (ALMEIDA; OLIVER, 2001; ANAYA-LOPEZ et al., 2006). Com base nestes estudos, observou-se que SCN apresentam capacidade de adesão às células mamárias bovinas. A capacidade adesiva de vários SCN foi semelhante à encontrada para *S. aureus*, mas a capacidade de invasão de *S. aureus* foi superior que a observada nas cepas de SCN. Na cultura de células, os isolados da mastite causada por SCN e *S. aureus* demonstraram atividade citotóxica, possivelmente causada por metaloproteinases (ZHANG; MADDOX, 2000). A maioria dos isolados de SCN de mastite caprina produziu ao menos um tipo de hemolisina, DNAse, e elastase (BEDIDI-MADANI; GREENLAND; RICHARD, 1998; DA SILVA et al., 2005). Kuroishi et al. (2003) observaram que alta porcentagem de *S. aureus* e SCN provindos de mastite subclínica, crônica ou aguda, produziram enterotoxinas estafilocócicas e/ou síndrome do choque tóxico tipo 1. De forma surpreendente, a produção de diferentes enterotoxinas estafilocócicas e a síndrome do choque tóxico tipo 1 foram comuns tanto nos isolados de SCN, quanto nos isolados de *S. aureus*, e da mesma forma em isolados de mastite subclínica ou mastite crônica ou aguda.

A formação de biofilme é um componente importante na persistência de IIM causadas por agentes causadores de mastite. A capacidade dos estafilococos em produzir biofilme pode ser estudada pela avaliação fenotípica da formação de biofilme e pela triagem de genes associados com essa formação. Proteínas associadas ao biofilme foram encontradas entre isolados de mastite bovina, incluindo *S. aureus, S. epidermidis, S. chromogenes, S. hyicus,* e *S. xylosus* (CUCARELLA et al., 2001). Oliveira et al. (2006) observaram que 6 de 16 isolados de *S. aureus* e 6 de 16 isolados de *S. epidermidis* provindos de mastite subclínica foram fenotipicamente positivos para formação de biofilme.

Um estudo buscou avaliar a capacidade de formação de biofilme por meio de análises de PCR de 255 isolados de mastite causada por SCN (TREMBLAY et al., 2013). As cinco espécies de SCN mais isoladas foram *S. chromogenes* (n = 111), *S. simulans* (n = 53), *S. xylosus* (n = 25), *S. haemolyticus* (n = 15), e *S. epidermidis* (n = 13), as quais representaram 85% dos isolados. *S. xylosus* foi a espécie com maior potencial em formar biofilme. Além disso, os pesquisadores sugeriram que determinados genes ou combinação de genes são

responsáveis pela formação de biofilme e que este fator de virulência está correlacionado com os dias em lactação das vacas com IIM causada por SCN.

Leitner et al. (2003) avaliaram a virulência de *S. aureus* e SCN por meio de modelo experimental com camundongos. Sete cepas de *S. aureus,* uma cepa de *S. chromogenes* e uma cepa de *S. intermedius* isoladas de mastite bovina crônica foram estudadas. Os camundongos foram experimentalmente infectados em um membro e posteriormente avaliados em relação à morbidade (artrite e gangrena) e mortalidade. Um isolado de *S. aureus* que produziu α-hemolisina foi o mais virulento, seguido por isolados que produziram α + β-hemolisina e β-hemolisina. Os isolados que apresentaram menor virulência foram as cepas não-hemoliticas de *S. aureus*, porém, mesmo estas, foram mais virulentas que os isolados de *S. chromogenes* e *S. intermedius* testados, os quais não causaram qualquer sinal de morbidade ou mortalidade.

2.3.5 Efeito da mastite causada por SCN sobre a produção de leite

Considerando que existe grande variação individual de produção de leite, é necessário um grande banco de dados para detectar diferenças significativas do efeito da mastite causada por diferentes patógenos sobre esta variável. Kirk et al. (1996) observaram que IIM causadas por SCN após 14 dias pós-parto não afetou a produção de leite durante os primeiros 5 meses de lactação em primíparas. Em contraste, Timms e Schultz (1987) observaram grande diferença (821 Kg) na produção de leite entre vacas sadias e vacas infectadas com SCN em dois rebanhos com alta prevalência de mastite causada por SCN.

Staphylococcus coagulase negativa são a principal causa de mastite de vacas de primeira lactação, o que sugere que estes agentes possam ser responsáveis por possíveis reduções de produção. No momento do parto, a glândula mamária de vacas primíparas ainda está em desenvolvimento. As glândulas mamárias de novilhas com infecção no pré-parto causadas por SCN, assim como por *S. aureus*, são menos desenvolvidas e apresentam maior infiltração leucocitária que quartos sadios (BODDIE et al., 1987; TRINIDAD; NICKERSON; ADKINSON, 1990; PIEPERS et al., 2011). Isto sugere que IIM causadas por SCN podem causar lesões na glândula mamária que poderão comprometer a produção e a qualidade do leite.

Estudos recentes sugerem que vacas ou novilhas com IIM causadas por SCN apresentaram produção de leite levemente superior que vacas não infectadas (COMPTON et al., 2007; SCHUKKEN et al., 2009; PIEPERS et al., 2010). Entretanto, perdas na produção de leite podem ser subestimadas quando vacas infectadas são comparadas com grupos de vacas sadias e não com sua produção antecedente à infecção (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). É plausível que vacas de alta produção e novilhas estejam em maior risco de adquirir IIM causadas por SCN que vacas de produção mais baixa. Gröhn et al. (2004) observaram que vacas multíparas com mastite clínica causada por SCN produziram de 2,3 a 2,7 kg/dia mais leite antes da infecção que vacas do grupo controle, sem mastite por estes agentes. No mesmo estudo, após o diagnóstico da mastite clínica por SCN, nenhuma diferença de produção de leite foi registrada entre vacas com e sem mastite causada por SCN. Desta forma, IIM causadas por SCN parecem estar concentradas em rebanhos de alta produção, e a comparação da produção de leite das vacas com e sem presença de IIM causada por SCN pode ter induzido a subestimativa de redução de produção causada por este grupo de agentes.

Paradis et al. (2010) avaliaram o efeito da mastite subclínica causada por SCN ou *S. aureus* durante o primeiro mês de lactação de novilhas sobre a produção e CCS do leite. As novilhas com IIM causadas tanto por *S. aureus*, quanto por SCN, apresentaram CCS superiores a observada em novilhas sem isolamento microbiológico. No entanto, após ajuste da produção de leite diária, nenhum dos agentes apresentou diferença de produção quando comparados com o grupo de cultura negativa durante toda a lactação.

No estudo de Schukken et al. (2009), vacas infectadas por SCN apresentaram produção de leite superior (0,45 Kg/dia) quando comparadas com vacas sem isolamento de patógenos causadores de mastite. Este resultado foi inesperado, apesar de outros autores já terem relatado este evento (PIEPERS et al., 2010). Um potencial mecanismo que explica esse aumento de produção em vacas infectadas poderia ser o efeito protetor do SCN sobre a ocorrência de casos clínicos (LAM et al., 1997). Além disso, evidências sobre diferenças em relação ao perfil de virulência entre espécies de SCN, como o potencial de invasão das células epiteliais também poderiam explicar este efeito protetor (ALMEIDA; OLIVER, 2001).

Perdas na produção de leite podem estar relacionadas com a persistência de IIM causadas por SCN (THORBERG et al., 2009). Quando a produção de vacas com IIM subclínica persistente foi comparada com a produção de vacas com IIM subclínica não-persistente, as vacas sem persistência de infecção apresentaram menor produção de leite que as vacas com infecção persistente. Por outro lado, as vacas com IIM subclínica persistente apresentaram menor produção de leite que vacas saudáveis. Vacas com IIM não-persistente

causada por *S. simulans* produziram menos leite que vacas saudáveis ou vacas com IIM persistente por *S. chromogenes, S. epidermidis,* ou *S. simulans.* Vacas com IIM não-persistentes causadas por *S. epidermidis* apresentaram produção de leite mais baixa que vacas com IIM persistentes causadas por *S. chromogenes* e *S. simulans*. As razões que podem explicar estes resultados não são claras, mas uma possível explicação é que vacas de maior produção podem ser mais propensas em apresentar infecções persistentes. Outra possível razão seria que vacas que apresentaram IIM não-persistentes podem ter tido algum episódio de IIM antes da primeira amostragem, o que resultou em redução da produção de leite neste grupo de vacas (THORBERG et al., 2009).

2.3.6 Efeito da mastite causada por SCN sobre a CCS

Apesar de não serem observados efeitos expressivos sobre a produção e composição de leite, a CCS de quartos infectados por SCN pode ser até 10 vezes maior que a CCS de quartos sadios, a qual tipicamente permanece abaixo de 50 x 10^3 células/mL (BODDIE et al., 1987; LAEVENS et al., 1997; BARKEMA et al., 1999). No entanto, a CCS de quartos mamários infectados por SCN, na maioria dos estudos, encontra-se em valor intermediário ao observado entre quartos mamários sadios e quartos mamários infectados por *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). Com base em amostras coletadas a campo, Schukken et al. (2003) observaram que a média de CCS em quartos sadios foi de 60 x 10^3 células/mL, enquanto que, em quartos infectados por SCN a CCS pode superar 600 x 10^3 células/mL (TAPONEN et al., 2007). Rainard et al. (1990) observaram que 38% das amostras de leite de quartos infectados por SCN apresentavam CCS >500 x 10^3 células/mL; em 42% a CCS foi de 200 a 500 x 10^3 células/mL, e em 20% foi <200 x 10^3 células/mL. Em estudo baseado em meta-análise, foi descrita média geométrica de CCS dos quartos infectados por SCN de 138 x 10^3 células/mL (DJABRI et al., 2002).

Em nível de vaca, IIM causadas por SCN podem causar aumentos significativos de CCS em comparação com vacas sadias. Taponen et al. (2007) observaram que a CCS de vacas infectadas por SCN foi 10 vezes superior a CCS observada em vacas sadias. No mesmo estudo, os autores observaram que não existe variação na CCS ao avaliar IIM persistentes e transitórias causadas por SCN. A CCS média dos quartos sem crescimento bacteriano durante

a lactação foi de 65 x 10^3 células/mL, enquanto que as médias dos quartos com IIM persistente e transitória causada por SCN foram 657,60 x 10^3 células/mL e 619,10 x 10^3 células/mL, respectivamente. Ao avaliar o efeito da IIM causada por SCN sobre a CCS de novilhas, a CCS das novilhas infectadas por SCN foi 0,63 vezes superior que para o grupo das vacas sadias (PARADIS et al., 2010).

Devido a grande variedade de espécies de SCN com potencial em causar mastite, a CCS pode sofrer variação conforme a espécie infectante. As espécies *S. chromogenes, S. simulans* e *S. xylosus* apresentaram CCS semelhantes à observada em amostras com isolamento de *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). Após desafio experimental com *S. chromogenes*, o pico médio de CCS de vacas leiteiras foi de 2.000 x 10^3 células/mL (SIMOJOKI et al., 2007). Fox et al. (1996) relataram que a média de CCS foi de 283 x 10^3 células/mL em vacas com IIM causada por *S. aureus* coagulase negativa, e 373 x 10^3células/mL em vacas com IIM causada por *S. aureus*, o que indica que a capacidade de coagular o plasma pode ter correlação positiva com a virulência. Em outro estudo, A CCS não diferiu entre as vacas com IIM subclínicas causadas por *S. chromogenes, S. epidermidis, ou S. simulans* (THORBERG et al. (2009). Porém, a CCS de vacas com IIM causada por essas últimas três espécies foi superior à observada no grupo de vacas sadias. Um estudo relatou que a média geométrica de CCS dos quartos mamários com IIM causada por SCN foi aproximadamente o dobro da CCS observada para os quartos mamários sadios (SAMPIMON et al., 2009). Ainda no mesmo estudo, baseado em nível de espécie, *S. chromogenes, S. capitis* e *S. xylosus* apresentaram CCS significativamente mais altas que os quartos com cultura negativa, enquanto a CCS média observada para as espécies *S. epidermidis* e *S. hyicus* apenas tenderam a ser superiores que os quartos sem isolamento microbiológico.

Apesar de que cada quarto mamário infectado por SCN possa apresentar apenas aumento moderado de CCS, a alta prevalência destes patógenos em rebanhos leiteiros pode resultar em efeito importante sobre a CCS do leite de tanque. Em um grande estudo de campo realizado nos EUA, estimou-se que IIM causadas por SCN foram responsáveis por 18% da CCS de leite de tanque de propriedades com baixa CCS (<200 x 10^3 células/mL). Considerando que a CCS do leite de tanque, a contribuição de SCN foi significativamente superior à causada por patógenos maiores (*S. aureus* e *S. agalactiae*) (SCHUKKEN et al., 2009). Tais resultados sugerem que, em rebanhos onde os patógenos maiores da mastite estão controlados, IIM causadas por SCN são um obstáculo importante para posterior melhoria da qualidade do leite.

2.3.7 Efeito protetor dos SCN sobre infecções intramamárias causadas por patógenos primários

Os patógenos primários da mastite (*S. aureus, S. agalactiae, S. uberis, S. dysgalactiae* e coliformes) são considerados mais patogênicos que os patógenos secundários por apresentarem efeito mais pronunciado sobre a sanidade da glândula mamária. Alguns estudos sugerem que quartos infectados por patógenos secundários (*Corynebacterium* spp. e SCN) são mais resistentes a subsequentes IIM naturalmente adquiridas causadas por patógenos primários (RAINARD; POUTREL, 1988; SCHUKKEN, Y. H. et al., 1989; REYHER et al., 2012). Possíveis mecanismos deste efeito podem estar relacionados ao aumento da CCS do leite de quartos infectados, ou ainda, pela ação de peptídeos antibacterianos (bacteriocinas) potencialmente produzidos pelos microrganismos (DE VLIEGHER et al., 2004).

De Vliegher et al. (2003) estudaram o efeito protetor *in vivo* da colonização da pele de tetos com *S. chromogenes* sobre a CCS do leite do terceiro ao quinto dia após o parto. Apesar de este estudo ter avaliado reduzido número de amostras, a colonização do canal do teto do teto com *S. chromogenes* indicou leve efeito protetor para CCS $\geq$ 200 x 10^3 células/mL durante o início de lactação. Em estudos em que quartos mamários foram experimentalmente infectados por *S. epidermidis* e *S. chromogenes* relatou-se efeito protetor da infecção contra *S. aureus* (LINDE; HOLMBERG; ASTROM, 1980; MATTHEWS; HARMON; SMITH, 1990).

O efeito protetor do SCN contra IIM causadas por patógenos principais da mastite difere conforme o delineamento experimental utilizado. Com base nos resultados de uma meta-análise, não foi observado efeito protetor dos patógenos secundários sobre a prevenção de IIM causadas por patógenos primários quando a avaliação foi realizada por meio de estudos observacionais. No entanto, foi observado efeito significativo de proteção quando a avaliação foi realizada por meio de estudos onde os quartos mamários foram experimentalmente infectados, em especial, pela infusão de patógenos primários em glândulas mamárias com infecções intercorrentes causadas por patógenos secundários (REYHER et al., 2012). No mesmo estudo, os autores observaram que quanto maior a dose infectante infundida nos quartos desafiados, menor é o efeito protetor dos patógenos menores.

Resultados contraditórios também foram relatados quanto ao efeito protetor do SCN contra IIM causadas por patógenos primários. Parker et al. (2007) demonstraram que IIM causadas por SCN adquiridas no pré-parto de novilhas aumentaram o risco de IIM causadas por *S. aureus* ou *Streptococcus uberis* no pós-parto. Resultados similares foram relatados em

um estudo realizado na Nova Zelândia (COMPTON et al., 2007). Em um estudo de campo com três fazendas leiteiras da Holanda, IIM causadas por SCN não foram relacionadas com a proteção contra a mastite causada por *S. aureus* e *S. uberis* (ZADOKS et al., 2001).

Mesmo se IIM causadas por SCN apresentarem algum efeito protetor contra IIM causada por agentes primários, o efeito negativo pode sobressair-se ao efeito hipoteticamente positivo. Infecções causadas por SCN induzem uma reação inflamatória no úbere, aumentam a concentração de vários marcadores da inflamação e causam lesões nos tecidos mamários. Assim, a possível dor ou desconforto causado pela mastite subclínica ou clínica leve é também algo relevante (MILNE et al., 2004). A colonização da pele ou canal do teto com SCN pode ter efeito protetor contra agentes primários da mastite sem apresentar efeitos deletérios pela IIM (DE VLIEGHER et al., 2003). O problema é como limitar a colonização da pele e canal do teto, a partir da qual o SCN pode invadir o úbere e desenvolver uma infecção intramamária. Até o momento, não há informações consolidadas sobre o possível efeito protetor de espécies SCN não-patogênicos contra agentes primários da mastite, nem há informações sobre as espécies de SCN ou cepas que não são virulentas e não-patogênicas ao úbere.

2.4 ESPÉCIES DE SCN RELACIONADAS COM IIM

2.4.1 Epidemiologia das IIM causadas por SCN

O SCN é tradicionalmente considerado como um grupo de agentes da microbiota normal da pele que pode causar mastite como um agente oportunista (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). No entanto, a epidemiologia da mastite causada por SCN ainda não está totalmente esclarecida, apesar de inúmeros estudos já terem identificado reservatórios de SCN. Grande variedade de espécies de SCN foi isolada do canal do teto de vacas, pele, e outros locais extramamários (DEVRIESE; DEKEYSER, 1980; MATTHEWS; HARMON; LANGLOIS, 1992; DUFOUR et al., 2012; PIESSENS et al., 2012).

A espécie de SCN mais isolada de IIM de vacas, especialmente em casos de mastite subclínica de novilhas, é *S. chromogenes* (DE VLIEGHER et al., 2003; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004; TAPONEN et al., 2006; DUFOUR et al., 2012; PIESSENS et al., 2012). Outra

espécie frequentemente isolada, especialmente durante a lactação, é *S. simulans* (TAPONEN et al., 2006; PIESSENS et al., 2011). Em alguns estudos nos quais SCN foram isolados de amostras de campo de mastite clínica ou subclínica, *S. simulans* foi a espécie predominante (WAAGE et al., 1999; TAPONEN et al., 2006). *S. hyicus* (JARP, 1991; WAAGE et al., 1999; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004) e *S. epidermidis* (AARESTRUP; JENSEN, 1997; THORBERG et al., 2006) também foram isolados de mastite causada por SCN. Várias outras espécies de SCN são menos isoladas de amostras de leite (CAPURRO et al., 2009; DUFOUR et al., 2012; PIESSENS et al., 2012).

Estudos indicaram que SCN causadores de mastite se originam de múltiplas fontes e podem usar diversas rotas de transmissão. As espécies predominantes de SCN presentes na cama e ambiente das vacas são *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* (MATOS et al., 1991). Essas mesmas espécies foram isoladas com frequência dos pelos, narinas, pele dos tetos e outras regiões do corpo (DEVRIESE; DEKEYSER, 1980; THORBERG et al., 2009; PIESSENS et al., 2012). Outras espécies, incluindo *S. chromogenes*, *S. warneri* e *S. epidermidis*, foram isoladas da pele das vacas (BODDIE et al., 1987; WHITE et al., 1989). *S. chromogenes* foi isolado da pele do esfíncter do teto, canal do teto e glândula mamária de novilhas não inseminadas com 10 meses de idade (BODDIE et al., 1987; DE VLIEGHER et al., 2003). *S. chromogenes* também é frequentemente encontrado em outras regiões do corpo das vacas como narinas, pelos, vagina e canal dos tetos de novilhas (WHITE et al., 1989). No estudo de De Vliegher et al. (2003), 20% das novilhas apresentaram ao menos um esfíncter do teto colonizado por *S. chromogenes* e a prevalência de colonização por esse agente aumentou com a idade dos animais. Entretanto, tal colonização não foi associada com IIM pelo mesmo agente.

A tomada de decisão em relação às práticas de manejo e controle da mastite é dependente da classificação da doença (contagiosa ou ambiental). Assim, determinar a epidemiologia das espécies de SCN potencialmente mais patogênicas pode ser importante para as fazendas leiteiras. A distribuição das espécies de SCN isoladas do leite e do ambiente difere entre rebanhos, e da mesma forma, os reservatórios primários diferem de acordo com a espécie envolvida (PIESSENS et al., 2011). Isto é indicativo de que fatores em nível de rebanho ou condições de ambiente determinam a prevalência de espécies de SCN em rebanhos leiteiros. Quando se comparou a distribuição de espécies de SCN nos diferentes nichos, certas espécies apresentaram preferência por determinados locais. *S. chromogenes* e *S. epidermidis* foram predominantemente isolados do leite (78,8 e 57,1% de todos isolados, respectivamente), e menos das amostras do ambiente. *S. haemolyticus* e *S. simulans* foram

regularmente isolados tanto de amostras de leite quanto ambiente. Espécies com origem predominantemente ambiental (100% dos isolados) foram o *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. fleuretti*, *S. cohnii*, *S. devriesei*, *S. xylosus*, *S. arlettae* e *S. succinus*. As espécies de SCN com características ambientais também estavam diferentemente distribuídas nos locais avaliados. *S. haemolyticus* e *S. equorum* foram isolados principalmente do ar, enquanto *S. sciuri* e *S. simulans* foram isolados principalmente do piso e da cama em uso, respectivamente. *S. xylosus* e *S. succinus* foram isolados com maior frequência do estoque de areia para cama (PIESSENS et al., 2011).

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre os isolados de quatro espécies de SCN (*S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*) frequentemente isoladas em glândulas mamárias, um estudo buscou comparar os genótipos derivados do ambiente e do leite e coletar dados sobre a disseminação de determinados genótipos entre as fazendas (PIESSENS et al., 2012). Para *S. haemolyticus*, uma considerável heterogeneidade genotípica foi observada entre e dentro dos rebanhos, apesar de genótipos idênticos terem sido encontrados em vários rebanhos. A diversidade genética observada dentro de rebanho entre os isolados de *S. haemolyticus* sugere a existência de fontes múltiplas além da potencial natureza contagiosa deste patógeno.

S. simulans raramente tem sido isolado de amostras extramamárias e parece ser bem adaptado ao úbere (TAPONEN, 2008). Vacas infectadas com *S. simulans* podem contaminar o próprio ambiente e estabelecer uma potencial fonte de infecção. A alta similaridade entre os genótipos de *S. chromogenes* sugere que genótipos específicos são bem adaptados à glândula mamária, o que é típico de um patógeno verdadeiro do úbere. Consequentemente, a transmissão entre vacas parece ser importante para esta espécie de SCN (PIESSENS et al., 2012).

Assim como para o *S. chromogenes*, o ambiente provavelmente não é um reservatório importante para o *S. epidermidis* (PIESSENS et al., 2011; SUPRÉ et al., 2011). *S. epidermidis* é relativamente pouco isolado da pele dos bovinos. Além disso, esta espécie é um microrganismo comensal de humanos e que pode ser introduzido nos rebanhos leiteiros pelas mãos dos ordenhadores (THORBERG et al., 2006; JAGLIC et al., 2010). Thorberg et al. (2006) observaram que as mesmas cepas que foram isoladas no leite de bovinos foram isoladas das mãos e cotovelos dos ordenhadores, o que indica que o *S. epidermidis* causador de mastite poderia ter sua origem nos humanos. A epidemiologia das IIM causadas por SCN pode ser comparada com a epidemiologia de IIM causadas pelo patógeno primário *S. aureus*. Como muitas espécies de SCN, *S. aureus* já foi isolado de diferentes locais extramamários.

Em contraste aos achados para o *S. epidermidis*, o *S. aureus* parece ser predominantemente específico do hospedeiro. Estudos demonstram que as cepas de *S. aureus* de humanos e bovinos são diferentes (SCHUKKEN, et al., 2009).

Em um estudo realizado recentemente, foi avaliada a eficácia da desinfecção dos tetos com solução iodada após a ordenha contra a colonização por SCN no canal do teto, e a incidência de IIM (QUIRK et al., 2012). Aparentemente, houve redução no número de espécies causadoras de IIM nos quartos do grupo tratamento (desinfecção dos tetos com solução iodada) em comparação ao grupo controle, o que denota um efeito seletivo da imersão dos tetos com solução iodada 1% sobre as espécies de SCN. *S. chromogenes* foi a espécie mais prevalente nas IIM dos quartos do grupo tratamento. Os dados apresentados neste estudo sugerem que uma das possibilidades da alta prevalência de *S. chromogenes* em rebanhos leiteiros pode estar associada à baixa sensibilidade ao pós-diping em comparação as outras espécies de SCN. No mesmo estudo, o uso de solução iodada para desinfecção dos tetos foi associado com uma redução significativa na colonização dos tetos por *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, e *S. hyicus*, mas não para o *S. chromogenes*.

Estudo recente objetivou identificar os fatores de risco ligados ao manejo em relação com a incidência, eliminação e prevalência de IIM causadas por SCN durante a lactação (DUFOUR et al., 2012). O tipo de material utilizado como a cama para vacas em lactação foi associado com a probabilidade de a ocorrência de IIM causada por SCN. O uso de areia ou maravalha foi associado com menor probabilidade de ocorrência de IIM causada por SCN que instalações que utilizaram palha como cama. Menor probabilidade de ocorrência IIM causada por SCN foi observada em rebanhos onde os ordenhadores recebiam bônus por qualidade do leite. No mesmo estudo, maior probabilidade de eliminação destes agentes foi observada para quartos de vacas com pernas traseiras muito sujas. Menor probabilidade de eliminação de SCN foi observada quando palha foi utilizada como cama nos piquetes de maternidade. Menor probabilidade de eliminação também foi observada em rebanhos que possuíam equipamento para teste de condutividade elétrica do leite durante a ordenha. Finalmente, maior probabilidade de eliminação de IIM causada por SCN foi observada em rebanhos onde as vacas foram compradas nos últimos 6 meses. Aparentemente, mais estudos são necessários para obter conclusões consistentes sobre a epidemiologia de IIM causadas por SCN em rebanhos leiteiros.

2.4.2 Persistência da mastite causada por SCN

Existe tendência de o pico de prevalência de IIM causada por SCN ocorrer durante o período pré-parto e ser eliminada no periparto, ou declinar durante a lactação (OLIVER; JAYARAO, 1997). A taxa de eliminação espontânea da mastite causada por SCN é geralmente de 60-70% (MCDOUGALL, 1998; WILSON et al., 1999). No entanto, evidências de que IIM causadas por SCN podem persistir por longos períodos foram observadas em outros estudos (TIMMS; SCHULTZ, 1987; RAINARD; DUCELLIEZ; POUTREL, 1990), inclusive, com infecções que duraram toda lactação das vacas (TAPONEN et al., 2006; GILLESPIE et al., 2009). Timms e Schultz (1987) relataram que somente 15,5% das infecções foram eliminadas espontaneamente, e IIM causadas por SCN apresentaram persistência por longos períodos. Rainard et al. (1990) observaram que 76% das infecções por SCN persistiram até o final do período de lactação, e a média de duração das infecções foi de 236 dias. De forma similar, Todhunter et al. (1993) relataram que a persistência média da mastite causada por SCN foi de 222 dias.

No estudo de Taponen et al. (2007), aproximadamente metade das IIM causadas por SCN persistiram por longos períodos durante a lactação. A maioria dos quartos com IIM persistente permaneceram infectadas desde sua detecção até o final da lactação. No mesmo estudo, observou-se que vacas multíparas, em geral, se infectaram com SCN mais tardiamente durante a lactação, enquanto as vacas primíparas se infectaram já no início da lactação. Resultados semelhantes foram observados em estudo que avaliou 158 isolados de SCN por meio de análises de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (GILLESPIE et al., 2009). Nesse estudo, a persistência de IIM causada por SCN foi avaliada em amostras de leite coletadas durante toda a lactação das vacas. A maioria (33/41) de SCN isolados do mesmo quarto mamário em mais de uma ocasião apresentaram o mesmo perfil de PFGE, o que indicou a capacidade de persistência de algumas IIM causadas por estes patógenos. No mesmo estudo, observou-se que IIM causadas por SCN persistiram na glândula mamária por períodos superiores à 10 meses.

Entretanto diferenças em relação à persistência podem existir entre as espécies de SCN (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). Aarestrup e Jensen (1997) avaliaram os quartos de novilhas de quatro semanas antes do parto até quatro semanas após o parto. Os autores observaram que IIM causadas por *S. chromogenes* e *S. epidermidis* desapareceram logo após o parto. Em contraste, glândulas mamárias com isolamento de *S. simulans* apresentaram persistência de

infecção por um período mais longo durante a lactação. No estudo de Thorberg et al. (2009), 58 a 76% das IIM persistentes foram relacionadas com as espécies *S. chromogenes, S. epidermidis* e *S. simulans*, mas foram infrequentes (11 a 22%) nas espécies *S. xylosus* e *S. haemolyticus*. Não são bem conhecidas as razões pelas quais algumas espécies de SCN são mais propensas a causar IIM persistentes que outras, porém, podem estar relacionada com as diferenças na virulência e/ou adaptação das espécies na glândula mamária (THORBERG et al., 2009).

2.5 TRATAMENTO DA MASTITE CAUSADA POR SCN

2.5.1 Uso de antimicrobianos para o tratamento de IIM causadas por SCN

A decisão sobre o melhor protocolo de tratamento da mastite causada por SCN é não é consensual entre os veterinários. A maioria dos pesquisadores concordam que a mastite causada por SCN resulta em altas taxas de cura espontânea e que estes microrganismos têm boa resposta ao tratamento antimicrobiano (RUEGG, 2012). Com base nos estudos disponíveis em relação ao tratamento da mastite causada por SCN, as taxas de cura variaram de 80% a 90% (MCDOUGALL, 1998; WAAGE et al., 2000; TAPONEN et al., 2003). Vacas com maior número de lactações apresentaram menores chances de cura que as vacas mais jovens (PYORALA; PYORALA, 1998; DELUYKER; VAN OYE; BOUCHER, 2005).

Entretanto, o tratamento de IIM causadas por SCN nem sempre é efetivo. Owens et al. (1997) conseguiu taxas de cura de 71% dos casos de mastite clínica causada por SCN com o uso de terapia antimicrobiana e observou redução da susceptibilidade de 47% de SCN à ampicilina. Borm et al. (2006) relatou que a terapia antimicrobiana de novilhas antes do parto não foi uniformemente eficaz no tratamento de IIM causadas por SCN.

No estudo de Taponen (2006), um total de 59% de casos de mastite em nível de quarto mamário foi tratado com antimicrobianos (75% foram casos clínicos e 42% subclínicos). A forma de apresentação da mastite não apresentou efeito sobre a taxa de cura. As taxas de cura de vacas de primeira ou mais lactações foram 76,2 e 65,7%, respectivamente. A duração dos tratamentos antimicrobianos (3, 4 ou 5 dias) não afetou a taxa de cura.

Em estudo que avaliou a susceptibilidade antimicrobiana de 170 isolados de SCN, 83 (48,8%) foram fenotipicamente susceptíveis a todos antimicrobianos testados (SAMPIMON et al., 2011). No mesmo estudo, 46% dos isolados expressaram resistência a um único antimicrobiano ou a uma única classe de antimicrobianos, e 10,6% dos isolados apresentaram resistência a múltiplas classes de drogas. Nesse estudo, os autores concluíram que as espécies de SCN isoladas de amostras de leite apresentaram diferenças nos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência, o que pode ter implicação na decisão de tratamento da mastite causada por esses microrganismos.

A avaliação da susceptibilidade de SCN aos antimicrobianos em nível de espécie pode gerar informações mais precisas sobre as diferenças espécie-específicas, e podem direcionar a terapia mais efetiva frente às IIM causadas por SCN. Sawant et al. (2009) avaliaram 168 isolados de SCN obtidos de amostras de leite por meio de ensaios laboratoriais de concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento da mastite. De 10 espécies isoladas no estudo, as mais predominantes foram *S. chromogenes* (n=61), *S. epidermidis* (n=37), *S. hyicus* (n=37) e *S. simulans* (n=16). A maioria dos isolados foi susceptível à ampicilina, oxacilina, cefalotina e ceftiofour. A eritromicina e a pirlimicina também foram efetivas na inibição de SCN *in vitro*. No entanto, de 37 isolados de *S. epidermidis*, 13 (35%) apresentaram resistência à eritromicina (≥16 μg/mL) e um isolado apresentou resistência à pirlimicina (≥64 μg/mL) e eritromicina (≥64 μg/mL). No mesmo estudo, um total de 17 isolados de *S. epidermidis*, 11 isolados de *S.chromogenes*, e um isolado de *S.hyicus* apresentaram resistência fenotípica à ampicilina (≥0,5 μg/mL). A heterogeneidade de resposta das espécies de SCN aos diferentes antimicrobianos indica a existência de genes de resistência espécie-específicos.

Não há um consenso sobre a duração mais correta para o tratamento da mastite causada por SCN. Ao estender o período de tratamento de 2 para 8 dias, não houve melhora nas taxas de cura de mastite subclínica causada por SCN (DELUYKER; VAN OYE; BOUCHER, 2005). Neste estudo, a taxa de cura da mastite causada por SCN foi de 44% sem o uso de qualquer tratamento. Com base na literatura disponível, a mastite causada por SCN responde bem à terapia antimicrobiana e que o tratamento tradicional de 2 a 3 dias é o suficiente para o tratamento destas IIM.

Segundo Pyörälä e Taponen (2009), um único isolamento de SCN de um quarto mamário não justifica economicamente o tratamento antimicrobiano, em particular, se somente um pequeno número de colônias forem detectados em uma amostra de leite. *Staphylococcus* coagulase negativa são bactérias comuns da pele do teto e podem, em

algumas situações, contaminar a amostra de leite. Além disso, a taxa de eliminação espontânea das infecções com SCN sem qualquer tratamento é alta. O tratamento é recomendado se forem notados sinais clínicos de grau moderado a grave. O tratamento IIM com antimicrobianos também pode ser recomendado em casos de mastite persistente causada por SCN (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Para os casos de mastite persistente, a terapia de vaca seca permanece sendo uma boa ferramenta devido às taxas de cura proporcionadas por essa prática de manejo (NEWTON et al., 2008).

2.5.2 Prevenção da mastite causada por SCN

A diversidade de espécies que compõem o grupo de SCN, bem como as diferenças epidemiológicas entre estas espécies, faz com que práticas de manejo sejam direcionadas para prevenir ambas as vias de transmissão, a contagiosa e a ambiental. Espécies como *S. chromogenes* e *S. epidermidis* parecem ser bem adaptadas à glândula mamária e é possível que estas espécies estejam relacionadas com a transmissão contagiosa (PIESSENS et al., 2011). Medidas de controle relacionadas ao manejo correto de ordenha e que são utilizadas na prevenção de patógenos contagiosos, como a desinfecção dos tetos após a ordenha, reduziram as IIM causadas por SCN nos rebanhos leiteiros (HOGAN, et al., 1995). Quirk et al. (2012) avaliaram o efeito da imersão dos tetos após a ordenha em solução iodada 1% sobre a colonização do canal do teto por espécies de SCN, sendo observado maior número de casos de colonização do canal dos tetos por SCN no grupo controle (sem imersão dos tetos em solução desinfetante) que no grupo em que os tetos foram imersos em solução iodada 1%. A imersão dos tetos em solução iodada 1% foi associada com redução significativa da colonização do canal dos tetos por *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, e *S. hycus*, porém, o mesmo não foi observado para *S. chromogenes*. O fato de o *S. chromogenes* apresentar maior resistência ao uso de soluções desinfetantes pode ser um fator que explica sua alta prevalência em rebanhos leiteiros. Diferenças entre espécies também foram observadas em outro estudo, em que o *S. epidermidis* foi mais prevalente em rebanhos nos quais a imersão dos tetos após a ordenha foi realizada com solução a base de ácido sulfônico que em rebanhos onde foi utilizada solução a base de iodo (HOGAN; WHITE; PANKEY, 1987).

O pico de prevalência de SCN ocorre durante o período pré-parto com redução gradual durante a lactação (OLIVER; JAYARAO, 1997). O manejo e higiene dos piquetes de

maternidade devem ser vistos como prioridade em um programa de controle de mastite. As práticas de manejo para reduzir a exposição aos patógenos da mastite nas áreas de vaca seca e maternidade são similares àquelas utilizadas nas instalações de vacas em lactação. Tais áreas devem ser limpas e drenadas para evitar o acúmulo de matéria orgânica (HOGAN; SMITH, 2012). O controle da mastite causada por espécies de SCN é difícil devido à impossibilidade de erradicação destes patógenos no ambiente. Entretanto, as práticas de manejo preventivo devem focar na redução da umidade e manutenção da higiene dos piquetes e instalações de vacas e novilhas durante o pré-parto.

Vacas permanecem deitadas por 12 a 14 horas por dia, e os seus tetos estão em contato direto com a cama ou outros materiais sobre onde descansam. Populações de bactérias na cama ou outros materiais são relacionados com o número de bactérias na extremidade dos tetos e com taxas de mastite clínica (ZDANOWICZ et al., 2004). Dufour et al. (2012) relataram que o tipo de material utilizado como cama para vacas em lactação foi significativamente associada com a probabilidade de ocorrência de IIM causada por SCN. No mesmo estudo, o uso de areia ou maravalha foi associado com menor probabilidade de ocorrência de IIM causada por SCN que instalações com uso de palha. Comparada com materiais orgânicos como maravalha, esterco reciclado, palha, e terra, a areia contém 100 vezes menos patógenos da mastite por grama de cama (HOGAN et al., 1989). No entanto, com o aumento do material orgânico e da umidade na cama com a prática de reutilização da areia, ocorre aumento da contagem de patógenos causadores da mastite (KRISTULA et al., 2005). Independentemente do tipo de cama utilizada, a remoção da umidade e sujidades do terço final da cama, onde os úberes estão em contato com o piso, podem reduzir significativamente as contagens bacterianas. Os currais devem ser limpos no mínimo duas vezes ao dia, quando os animais são levados para ordenha. A aplicação de cal em pó duas vezes ao dia pode ser uma prática vantajosa na redução das contagens bacterianas na cama (HOGAN; SMITH, 2012).

Quartos mamários de vacas com acesso a pastagens apresentaram menor probabilidade de ocorrência de novas IIM causadas por SCN quando comparados com quartos mamários de vacas confinadas (DUFOUR et al., 2012). Em sistemas de pastejo, a carga de patógenos ambientais normalmente é reduzida em comparação com sistemas de confinamento total. Solos cobertos com plantas forrageiras em piquetes de pastagem apresentaram contaminação mínima por patógenos ambientais da mastite (HOGAN; SMITH, 2012). No entanto, a exposição às bactérias aumenta quando a oferta de pasto nos piquetes diminui devido à superlotação e manejo inadequado de rotação de piquetes (GREEN et al., 2007; LOPEZ-

BENAVIDES et al., 2007). De forma similar às instalações de vacas secas, a radiação solar e a manutenção de um ambiente seco reduz a carga bacteriana nos piquetes de pastagens.

Dentre outras medidas preventivas contra mastite, o uso de selantes internos tem sido utilizado como uma alternativa ou complemento à terapia de vaca seca. O uso de selantes internos foi testado em novilhas e reduziu o risco de mastite após o parto, inclusive as causadas por SCN (PARKER et al., 2007).

O grupo SCN é formado por grande variedade de espécies com potencial em se adaptarem tanto ao ambiente quanto na glândula mamária. Entretanto, o conhecimento epidemiológico sobre as espécies de SCN envolvidas na mastite pode auxiliar na decisão de estratégias direcionadas de manejo a fim de prevenir as IIM causadas por esses patógenos em rebanhos leiteiros.

2.6 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SCN

2.6.1 Métodos fenotípicos e genotípicos

Apesar de alta incidência e prevalência de IIM causadas por SCN, programas de controle espécie-específicos para esses agentes não são comuns em rebanhos leiteiros. De forma geral, os laboratórios de diagnóstico não utilizam sequer metodologias de identificação fenotípica de SCN provindas de amostras clínicas de animais (RUEGG, 2009). É consenso entre médicos veterinários e pesquisadores que exames microbiológicos de amostras de leite são indispensáveis para efetividade de um programa de controle de mastite. Devido à redução da prevalência de patógenos principais da mastite (*S. aureus* e *S. agalactiae*) relatada em diversos países, maior atenção tem sido direcionada para o controle de patógenos ambientais e/ou secundários (SCN e *Corynebacterium* spp) (RUEGG, 2009).

Em muitos laboratórios de rotina, a identificação de *Staphylococcus* spp. é baseada no aspecto morfológico das colônias, coloração de Gram e produção de catalase e coagulase. Esses testes permitem somente a classificação dos isolados em dois grupos, *S. aureus* ou SCN. O que define o grupo de SCN é somente a reação negativa na prova de coagulase, a qual é simplesmente uma característica fenotípica da bactéria. A emergência de SCN como grupo de microrganismos com alta prevalência em rebanhos leiteiros, bem como, as

diferenças epidemiológicas observadas entre as espécies que compõem esse grupo, justifica a necessidade de métodos baratos, rápidos e precisos para sua identificação em nível de espécie (ZADOKS; WATTS, 2009).

Alguns métodos de identificação fenotípica têm sido utilizados no diagnóstico laboratorial de *Staphylococcus* spp. Os métodos de identificação fenotípica são baseados na expressão de características genéticas dos isolados bacterianos. O fenótipo das bactérias inclui características como morfologia, características de crescimento, capacidade de metabolizar substratos, resistência antimicrobiana e outras características que resultam da expressão de DNA, mas que não estão relacionados com a avaliação do DNA propriamente dito (ZADOKS; WATTS, 2009).

Testes comerciais como as plataformas miniaturizadas API 20 Staph system (bioMérieux), API ID 32 Staph (bioMérieux), Staph-Zym (Rosco) e Vitek system (bioMérieux) foram utilizados para identificação de espécies de SCN (BANNERMAN; KLEEMAN; KLOOS, 1993; DEVRIESE et al., 1994; SIVADON et al., 2004). Testes como API Staph (bioMérieux, França) e Staph-Zym (Rosco, Dinamarca) não identificaram todas as espécies de *Staphylococcus*, especialmente aquelas provindas de amostras de animais (BES et al., 2000). *S.chromogenes e S. hyicus*, as duas espécies mais comuns de SCN isoladas de vacas com mastite, não foram reconhecidas por uma versão anterior do Staph-Zym system, enquanto espécies originárias de medicina humana (*S. simulans, S. xylosus* e *S. capitis*) foram identificadas corretamente (WATTS; WASHBURN, 1991). Versões anteriores de Vitek e API Staph também apresentaram limitações para a identificação de *S. chromogenes* e *S. hyicus* (MATTHEWS; OLIVER; KING, 1990). Este é um exemplo que indica que a maioria das plataformas de análises para identificação de *Staphylococcus* spp. foram desenvolvidas para identificação de patógenos de humanos e não de animais, e que tais metodologias podem não identificar com precisão os patógenos que acometem animais (ZADOKS; WATTS, 2009). Adicionalmente, falhas de identificação foram relatadas inclusive em medicina humana (COUTO et al., 2001; HEIKENS et al., 2005; SKOW et al., 2005).

Outra limitação inerente aos métodos fenotípicos pode estar relacionada com a existência de variabilidade na expressão das características fenotípicas que ocorre entre os isolados da mesma espécie (BANNERMAN et al., 1993; HEIKENS et al., 2005). O fato de os resultados fenotípicos se basearem em alterações de cor e consistência e reações bioquímicas resulta em interpretação subjetiva (CARRETTO et al., 2005). Segundo Zadoks e Watts (2009), a variabilidade de expressão das características fenotípicas e a subjetividade da interpretação dos resultados são fatores limitantes para a reprodutibilidade do teste.

Falhas de identificação ocorridas no passado ou alterações na taxonomia podem ter contribuído para a ocorrência de falhas de identificação de espécies por meio de métodos fenotípicos (CARRETTO et al., 2005). Por exemplo, até 1986, *S. chromogenes* e *S. hyicus* foram classificados como subespécies de *S. hyicus* (HAJEK et al., 1986). As tecnologias de identificação microbiológica estão em constante desenvolvimento, o que torna indadequado penalizar uma metodologia por falhas de identificação ocorridas no passado. No entanto, uma vez realizada a reclassificação das espécies, os resultados precedentes talvez necessitam de nova interpretação (ZADOKS; WATTS, 2009). As normas para descrição de novas espécies de *Staphylococcus* foram definidas pelo Subcomitê de taxonomia de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática em 1999 e foi majoritariamente baseado em padrões fenotípicos (FRENEY et al., 1999). Atualmente, diversos métodos genotípicos têm sido utilizados para identificação de *Staphylococcus* spp.

Métodos de identificação genotípica como reação da cadeia em polimerase (PCR), sequenciamento de genes de manutenção e genotipagem por meio polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) foram usados na identificação de SCN (BES et al., 2000; TAPONEN et al., 2007). Ao passo que as metodologias moleculares se tornaram mais comuns, é provável que as formas de infecção e transmissão da mastite causada por SCN sejam mais bem entendidas (RUEGG, 2012). O uso de métodos genotípicos proporcionou precisão na identificação de SCN e é muito eficiente para propósitos científicos. Porém, o seu uso em nível de campo não está difundido por falta de definição quanto aos fatores de patogenicidade, e em relação aos potenciais prejuízos causados pelas diferentes espécies de SCN (RUEGG, 2009).

Análises de PCR, quando utilizadas para identificação de microrganismos, oferece vantagens expressivas devido a sua velocidade no diagnóstico e especificidade. O benefício da velocidade de identificação se deve a capacidade do teste em amplificar uma fita específica de qualquer DNA microbiano, o que pode gerar resultado em menos de 4 horas. Nas culturas microbianas, levaria no mínimo um dia para uma única células bacteriana se transformar em uma colônia visível (BRITTEN, 2012). No entanto, o principal desafio em relação à PCR é que a maioria dos métodos não diferencia bactérias vivas de bactérias mortas, mesmo em casos onde a infecção foi resolvida. A frequência de ocorrência de bactérias mortas na mastite bovina ainda não é bem compreendida. Estudos sugerem que macrófagos fagocíticos que contém o DNA bacteriano podem estar presentes em amostras de leite por dias ou mesmo semanas após a cura de uma infecção transitória (BRITTEN, 2012).

Métodos genotípicos utilizados para identificação de espécies de SCN incluem análises de AFLP (TAPONEN et al., 2006; TAPONEN et al., 2007), ribotipagem (CARRETTO et al., 2005), análises de tDNA-ILP (ROSSI et al., 2001; STEPANOVIC et al., 2005), análises de PCR-RFLP (SANTOS et al., 2008), e sequeciamento de genes de DNA (SIVADON et al., 2004; HEIKENS et al., 2005) . Dentre os gêneros bacterianos, o 16s rRNA é o gene alvo mais comum para sequenciamento de DNA. No entanto, espécies de SCN são muito próximas genotipicamente, e o sequenciamento do gene 16S rRNA pode não possuir poder discriminatório suficiente para diferenciar todas as espécies de SCN (SHAH et al., 2007). Portanto, metodologias de identificação para o diagnóstico de SCN foram desenvolvidas com base na avaliação de genes de manutenção como *cpn*60, *dna*J, *rpo*B, *sod*A, *hsp*60 e *tuff*. Uma vantagem dos métodos baseados no sequenciamento de DNA sobre os métodos fenotípicos e outros métodos genotípicos (ribotipagem e tDNA-ILP) é que ele fonece uma medida quantitativa até o último par de base do código genético em relação ao isolado identificado (ZADOKS; WATTS, 2009).

Segundo Zadoks e Watts (2009) os métodos genotípicos apresentaram maior sensibilidade e especificidade que os métodos genotípicos para identificação das espécies de SCN. Entretanto, fatores como velocidade de diagnóstico, facilidade de uso, custo do procedimento, disponibilidade de equipamentos, mão-de-obra qualificada e objetivo da identificação microbiológica são determinantes na escolha do método mais apropriado para ser utilizado. No caso da identificação de SCN para o controle da mastite, o melhor método será o mais fácil, simples e barato e com adequado nível de diferenciação entre as espécies(ZADOKS; WATTS, 2009).

2.6.2 Identificação de SCN por espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, por meio da determinação de suas massas moleculares na forma iônica baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por *m/z* (*mass to charge ratio*) (SOUZA, 2008).

Um espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores. A ionização é o processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de *m/z*. Para a ionização por MALDI, a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização, e que quando seca, cristaliza-se juntamente com o analito. A transferência de energia por MALDI ocorre por meio da irradiação pulsada de laser. A matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito. Uma vez ionizados, os íons são levados para dentro do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo. Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (RUELLE et al., 2004).

Analisadores de tempo de vôo são baseados no princípio de que os íons com a mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Portanto, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são aceleradas através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com "tempos de vôo" diferentes (BARREIRO, 2011). Assim, o íon de menor massa (menor valor de *m/z*) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (HOFFMANN; STROOTBART, 2007).

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens. Utilizando esse método, bactérias podem ser identificadas comparando seu espectro de massas (obtido em poucos segundos), com espectros referência de cepas por meio de análise estatística multivariada.

Em relação à identificação microbiológica, a MS se baseia na diferenciação de perfis proteicos bacterianos (LOONEN et al., 2012). A metodologia de MALDI-TOF MS foi aplicada pela primeira vez para identificação de microrganismos por volta de 1975 (ANHALT; FENSELAU, 1975), e desde então, tem sido utilizada para diagnóstico microbiológico baseado na diferenciação de proteínas ribossomais dos microrganismos (BIZZINI; GREUB, 2010; BENAGLI et al., 2011).

A MALDI-TOF MS apresentou alta reprodutibilidade entre laboratórios de identificação de microrganismos (MELLMANN et al., 2009), e rapidamente foi incorporada nas rotinas de diagnóstico microbiológico clínico de humanos. Esta técnica requer pouca

experiência, utiliza poucos instrumentos e o treinamento do operador é relativamente rápido (BARREIRO et al., 2010). Quando comparada com as metodologias de análise baseadas no DNA bacteriano, a MALDI-TOF MS requer menor quantidade de material biológico e envolve protocolos de preparação mais simples sem precisar de análises iniciais como a coloração de Gram (ILINA et al., 2009; MELLMANN et al., 2009). No entanto, algumas limitações relacionadas à MALDI-TOF MS são o alto custo de aquisição do equipamento analisador, a dificuldade em se analisar culturas mistas e a necessidade da existênciado perfil da bactéria de interesse estar contida no banco de dados do software Biotyper.

Alguns estudos compararam a metodologia de MALDI-TOF MS com metodologias genotípicas e fenotípicas tradicionalmente utilizadas na identificação microbiológica de SCN, especialmente na clínica médica de humanos (DUPONT et al., 2010; LOONEN et al., 2012). No estudo de Dupont et al. (2010), 234 isolados de SCN representaram 20 espécies e foram analisados por MALDI-TOF MS e comparados com dois métodos rápidos de identificação automatizados, BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems, França) e VITEK-2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França). A MALDI-TOF MS foi a metodologia com maior taxa de identificação de espécies de SCN com 93,2% em relação ao sequenciamento do gene *sodA*. As taxas de identificação para as técnicas Phoenix e o VITEK-2 foram de 75,6% e 75,2%, respectivamente.

Outro estudo buscou determinar a melhor metodologia de identificação em nível de espécie de SCN (LOONEN et al., 2012). Cinco metodologias foram comparadas, sendo duas fenotípicas (VITEK-2 e API Staph 32), duas técnicas de sequenciamento de genes (16S rRNA e sequenciamento do gene *tuff*) e a MALDI-TOF MS com extração das proteínas ribossomais bacterianas pela técnica de ácido fórmico. A técnica de MALDI-TOF MS, mais uma vez, apresentou taxa superior de identificação de SCN com 99,3% de identificação. Para as demais técnicas avaliadas as taxa de identificação foram respectivamente: VITEK-2 (92,3%), API Staph 32 (85,9%), sequenciamento do gene *tuff* (93%) e sequenciamento do gene 16S rRNA (70,4%).

Com base na literatura disponível, a MALDI-TOF MS foi avaliada em apenas um estudo para a identificação de microrganismos causadores de mastite (BARREIRO et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos, esta técnica pode tornar o diagnóstico da mastite mais rápido, preciso e espécie-específico.

3 IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE VACAS COM MASTITE POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

RESUMO

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) é o grupo de bactérias causadoras de mastite bovina com maior frequência de isolamento em vários países. No entanto, uma das limitações relacionadas ao diagnóstico de SCN em nível de espécie se deve à carência de um método preciso, de fácil execução e que diferencie entre as espécies bacterianas que compõem este grupo. O objetivo deste estudo foi avaliar a metodologia de dessorção a laser assistida por matriz, seguida de espectrometria de massas por tempo de vôo (MALDI-TOF MS) para identificação de espécies de SCN isoladas de vacas com mastite. Amostras compostas de leite foram coletadas de 1.242 vacas pertencentes a 21 rebanhos leiteiros. Após isolamento por cultura microbiológica, amostras de leite de quartos mamários foram coletadas das vacas com isolamento positivo de SCN. Os isolados de SCN foram diferenciados genotipicamente pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (RFLP) e por MALDI-TOF MS. Treze cepas de referência de espécies de SCN normalmente isoladas da mastite foram utilizadas como controle positivo para as duas metodologias de identificação. De um total de 108 amostras identificadas em nível de espécie pela técnica de PCR-RFLP, 103 (95,37%) foram identificadas pela MALDI-TOF MS em nível de espécie. Cinco isolados de SCN apresentaram identificação em nível de gênero (*Staphylococcus* spp.). Todas as cepas de referência foram corretamente identificadas por ambas as metodologias de identificação. A espécie mais prevalente isolada de amostras coletadas de vacas com mastite foi *Staphylococcus chromogenes* (n=80; 74,07%), seguido de *S. saprophyticus* (n=6; 5,55%) e *S. haemolyticus* (n=5; 4,63%). Conclui-se que a técnica de MALDI-TOF MS é um método sensível (95,37%) e que pode ser utilizado como método de identificação de espécies de SCN causadoras de mastite.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. Diagnóstico da mastite. Identificação bacteriana. *Staphylococcus* coagulase negativa.

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococci (CNS) is one group of bacteria causing bovine mastitis and being isolated with great frequency in many countries. However, one of the limitations related to the diagnosis of CNS to the species level is the lack of an accurate and easy to perform method that could differentiate between bacterial species comprising this group. The aim of this study was to evaluate the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of CNS species isolated from cows with mastitis. Milk composite samples were collected from 1,242 cows from 21 dairy herds. After bacteria isolation by microbiological culture, milk samples of mammary quarters were collected from cows with positive isolation of CNS. The CNS isolates were genotypically differentiated by polymerase chain reaction (PCR) associated with restriction fragment length polymorphism assays and by MALDI-TOF MS. Thirteen SCN reference strains normally isolated from mastitis were used as positive controls for the two identification methods. Of the 108 samples identified by PCR-RFLP to the species level, 103 (95.37%) were also identified by MALDI-TOF MS to the species level. Five isolates had reliable identification at genus level (*Staphylococcus* spp.). All the reference strains were correctly identified by both identification methods. The most prevalent species isolated from samples collected from cows with mastitis were *Staphylococcus chromogenes* (n = 80, 74.07%), followed by *S. saprophyticus* (n = 6, 5.55%) and *S. haemolyticus* (n = 5, 4.63%). We conclude that the technique of MALDI-TOF MS is a sensitive method (95.37%) that can be used as an identification method for the species of CNS causing mastitis.

Keywords: Mass spectrometry. Mastitis diagnosis. Bacteria identification. Coagulase negative staphylococci.

3.1 INTRODUÇÃO

Mais de 200 causas infecciosas já foram identificadas na mastite bovina (SHARMA et al., 2012), dentre as quais, o gênero *Staphylococcus* é formado por 52 espécies e subespécies (TAPONEN, 2008). *Staphylococcus* coagulase negativa é o grupo de microrganismos causadores de mastite mais prevalente em rebanhos leiteiros, especialmente naqueles em que

os patógenos principais foram controlados em decorrência de programas de tratamento e prevenção (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

A identificação em nível de espécie possibilita caracterizar as diferenças epidemiológicas entre as espécies de SCN, porém o desenvolvimento de uma técnica rápida e precisa tem sido um desafio por muitos anos. Supré et al. (2011) relataram que espécies de SCN como *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* apresentaram CCS similares a observada no leite de vacas com mastite causada por *S. aureus*. Estudos também demonstraram que *S. chromogenes* e *S. epidermidis* apresentaram maior afinidade pela glândula mamária que outras espécies (*S. equorum, S. sciuri, S. fleuretti, S. cohnii, S. devriesei, S. xylosus, S. arlettae e S. succinus*), as quais foram mais relacionadas com o ambiente (THORBERG et al., 2009; PIESSENS et al., 2011). As diferenças epidemiológicas e de patogenia observadas entre SCN são fatores que podem justificar diferenciação entre as espécies deste grupo de agentes causadores de mastite.

Dezesseis espécies de SCN foram isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica (CAPURRO et al., 2009). Entretanto, a maioria das metodologias de diagnóstico da mastite causada por SCN baseia-se em características fenotípicas, como morfologia das colônias, potencial hemolítico e testes bioquímicos (DEVRIESE et al., 1985). Outra possibilidade de diagnóstico são os painéis bioquímicos convencionais, no entanto, estes testes são caros e/ou demorados e não apresentaram precisão no diagnóstico de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras coletadas de animais (BES et al., 2000).

O uso de técnicas de biologia molecular oferecem vantagens devido a maior velocidade no diagnóstico e especificidade (BRITTEN, 2012), porém, não existe uma metodologia padrão, amplamente aceita, para a identificação de espécies de SCN por meio de padrões genotípicos. Além disso, o principal desafio de análises de reação em cadeia pela enzima polimerase (PCR) é a impossibilidade de distinção entre bactérias vivas e bactérias mortas presentes no leite, o que pode levar a um resultado falso-positivo (BRITTEN, 2012). Desta forma, os programas de diagnóstico da mastite ainda carecem de uma metodologia rápida e que de forma confiável discrimine entre as espécies de SCN isoladas de IIM.

A metodologia de dessorção a laser assistida por matriz, seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS) é uma técnica que se baseia na diferenciação dos perfis proteicos dos microrganismos e tem sido utilizada no diagnóstico microbiológico clínico em medicina humana (BIZZINI; GREUB, 2010; BENAGLI et al., 2011). No entanto, apenas um estudo avaliou a técnica de MALDI-TOF MS para identificação de microrganismos causadores de mastite bovina (BARREIRO et al., 2010). Apenas 33 amostras

de leite de vacas com mastite foram analisadas pela MALDI-TOF MS no estudo anterior, e apesar de 10 isolados de SCN terem sido identificados, o estudo não teve como objetivo a identificação de espécies deste grupo de bactérias isoladamente. Entretanto, de acordo com os resultados descritos por Barreiro et al. (2010), esta técnica pode tornar o diagnóstico da mastite rápido, preciso e espécie-específico. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a técnica de MALDI-TOF MS para o diagnóstico de SCN causadores de mastite bovina em nível de espécie.

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de MALDI-TOF MS para a identificação das espécies de SCN isoladas do leite de quartos mamários de vacas com mastite. Além disso, o estudo buscou determinar a frequência de isolamento de espécies de SCN por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase, associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP) a partir de amostras de leite de vacas com mastite.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de rebanhos e de vacas e coleta de amostras de leite

O procedimento de coleta de amostras de leite foi realizado em duas etapas. Na primeira, realizou-se coleta asséptica de amostras compostas de leite (n=1.242) de todas as vacas em lactação de 21 rebanhos leiteiros. Os rebanhos foram selecionados com base na proximidade do laboratório, disponibilidade para participar do estudo, e existência de equipamento de ordenha mecanizada. As amostras de leite foram coletadas seguindo os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (NMC, 1999). Brevemente, precedendo a ordenha, os tetos foram imersos em solução de iodo 0,5%, e decorridos 30 segundos, foram secos com papel-toalha descartável; em seguida, os três primeiros jatos foram desprezados em caneca de fundo preto. Cada amostra foi coletada diretamente em tubo estéril e imediatamente acondicionadas em caixas isotérmicas (5°C). Por fim, as amostras foram transportadas ao laboratório para identificação das vacas com mastite causada por SCN.

Na segunda etapa de coleta, em um período inferior a 15 dias, amostras de leite de quartos mamários foram coletadas das vacas com isolamento de SCN. Os isolados foram criopreservados em meio de cultura a -20°C, e posteriormente recultivados para identificação em nível de espécie por meio das técnicas de MALDI-TOF MS e PCR-RFLP.

Identificação bacteriana por cultura microbiológica

Em um prazo inferior a 15 dias após a coleta, as amostras de leite (compostas e de quartos mamários) foram descongeladas, homogeneizadas e submetidas à cultura microbiológica. Para cada amostra de leite, 10 µL de leite foram inoculados em ágar sangue com 5% de sangue bovino desfibrinado. As placas foram incubadas aerobicamente à temperatura de 37°C por 72h, e após incubação foram feitas leituras a cada 24 h para caracterização das colônias (número de colônias, pigmentação, tamanho, presença de hemólise) e presença de contaminantes. Para determinar as características morfológicas e identificar os gêneros bacterianos realizou-se o exame de esfregaços corados pelo método de Gram e provas fenotípicas de catalase, coagulase e acetoína, segundo recomendações do NMC (1999). Assim, foram considerados *Staphylococcus* spp., microrganismos com morfologia de cocos Gram positivos com reação positiva na prova de catalase; *Streptococcus* spp. foram identificados como cocos Gram positivos e catalase negativa; *Arcanobacterium pyogenes* como bastonetes Gram positivos e catalase negativa; e *Corynebacterium* spp. / *Nocardia* spp. / *Bacillus* spp. / *Arcanobacterium* spp., como bastonetes Gram positivos e catalase positiva. Para os cocos Gram postivos foi realizada a prova da coagulase para diferenciação dos patógenos em *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) ou *Staphylococcus* coagulse negativa (SCN). *Staphylococcus aureus* foram identificados quando apresentaram reação positiva nas provas de coagulase e acetoína. Microrganismos Gram negativos foram identificados apenas como bastonetes ou cocobacilos Gram negativos.

A identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada pela caracterização de colônias pequenas a médias (1-3 mm de diâmetro), circulares, branco-amareladas ou amarelas, levemente elevadas, com presença ou não de hemólise, cremosas, com reação positiva na prova da catalase. Os isolados de SCN submetidos à microscopia apresentaram-se como cocos Gram positivos (arranjados ou não em forma de “cachos de uva”), sem motilidade e com ausência de esporos. Para os isolados que apresentaram as características previamente mencionadas, realizou-se a prova de coagulase com a utilização de plasma bovino desfibrinado. Os isolados bacterianos foram identificados como SCN quando foram isolados cocos Gram-positivos, com reação positiva na prova da catalase, negativa na prova de coagulase e negativa na prova de acetoína (NMC, 1999). Todos os isolados foram mantidos em 1,5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) contendo 10% de glicerina sob temperatura de -20°C até a realização das análises pelas metodologias de PCR-RFLP e MALDI-TOF MS. Amostras que apresentaram mais do que dois isolados morfologicamente diferente foram consideradas contaminadas.

As seguintes cepas padrão foram utilizadas como controle para comparação das espécies de *Staphylococcus* pelas técnicas de MALDI-TOF MS e PCR-RFLP: *Staphylococcus capitis* ATCC 27840, *Staphylococcus cohnii* ATCC 29974, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Staphylococcus hominis* ATCC 27844, *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249, *Staphylococcus sciuri* ATCC 29061, *Staphylococcus chromogenes* ATCC 43764, *Staphylococcus caprae* ATCC 35538 e *Staphylococcus simulans* ATCC 27848 e *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.

Antes de iniciar as análises de PCR-RFLP e MALDI-TOF MS, todas as cepas de referência e as amostras identificadas como SCN foram descongeladas e recultivadas em meio de cultura ágar sangue por 24 horas. Apenas os isolados que apresentaram crescimento na cultura microbiológica e com ausência de contaminação foram submetidos às análises de identificação por ambas as metodologias.

Protocolo de extração do DNA

As cepas de referência e os isolados de SCN foram recultivadas em 5 mL de BHI a 37°C por 12 horas. Após o cultivo, transferiu-se 1,0 mL do caldo de cultura para um tubo (1,5 mL) autoclavado. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 16.000 x g/min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento dissolvido em 500µL de tampão TE 1X. Após, a solução bacteriana foi centrifugada em velocidade de 20.000 x g/2 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento novamente ressuspendido em 500µL de tampão TE 1X. A solução foi novamente centrifugada a 20.000 x g/2 min, o sobrenadante desprezado e adicionou-se ao sedimento bacteriano 40µL de tampão de lisozima (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1M NaCl; 5% Triton X-100; água deionizada). Após homogeneização do conteúdo em um agitador tipo vortex por 10 segundos, 10µL de lisozima (10 mg/mL em 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; SERVA Electrophoresis, Heidelberg) foi adicionado em cada amostra. Depois de nova homogeneização, o conteúdo foi mantido em temperatura ambiente por 10 min, com agitação do tubo aos 5 min. As etapas seguintes foram realizadas por meio do kit comercial (Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Reino Unido) disponível para extração de DNA de bactérias Gram positivas conforme recomendações do fabricante.

Ao término do protocolo estabelecido pelo kit comercial de extração, o DNA bacteriano passou pelo procedimento de precipitação segundo metodologia proposta por Sambrook e Russel (2001). Brevemente, 500 µL de álcool etílico absoluto P.A. (Dinâmica

Química Contemporânea, Brasil) e 20 µL de acetato de sódio (3M) foram adicionados à amostra. Depois de completa homogeneização, a amostra foi armazenada a -20°C por 12 horas. Em outra etapa, as amostras passaram pelo processo de precipitação do DNA, na qual foram centrifugadas a 14.000 rpm/35 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 500 µL de álcool etílico 75%. As amostras foram novamente centrifugadas (7.500 x g/5min), o sobrenadante desprezado e os tubos foram deixados em posição invertida por 15 min. As amostras contendo o precipitado de DNA foram ressuspendidas em 40 µL de tampão TE 1X e incubadas a temperatura de 55°C por 10 min. Ao término desta incubação, as amostras passaram por nova incubação (5 min) em um recipiente com gelo. Posteriormente, a concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas pela leitura de 1µL da amostra em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Reação de polimerase em cadeia

As reações de PCR foram realizadas em termociclador com controle de temperatura programável Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster, EUA). A mistura de reação, com volume final de 50µL por amostra, foi constituída de água deionizada (38 µL), quatro desoxinucleotídios 5'-trifosfatados (2,5 mM de cada dNTP; volume final de 1 µL) (Invitrogen), 5 µL de tampão 10X da enzima (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 – (Invitrogen), 1,5mM (2 µL) de $MgCl_2$ (Invitrogen), 1 U (1 µL) de Taq DNA-polimerase (Invitrogen), 100ng (1 µL) de DNA e 0,5 µg (1 µL) de cada um dos iniciadores, H279A [5' GAIIIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC 3'] e H280A [5'(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCIGGIGC(TC)TT 3'.

O protocolo para a amplificação do gene *groEL* foi realizado segundo Goh et al. (1996) e compreendeu uma etapa inicial de aquecimento a 95ºC por 3 minutos, para a desnaturação do DNA, seguido por 40 ciclos de 94ºC por 1 minuto (desnaturação), 53ºC por 2 minutos (anelamento) e 72ºC por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72ºC durante 10 minutos. A presença dos produtos obtidos por PCR foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose.

Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose 0,8% (p/v) foi preparado em tampão TAE 1X. Foram adicionados 1/5 do volume de tampão de amostra às preparações de DNA e estas foram submetidas à

eletroforese em cuba horizontal (Life Technologies – Horizon 11-14) a 60 V, em tampão TAE 1X por aproximadamente 40 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 minutos. Posteriormente, o gel foi observado através do emprego de um transiluminador de luz UV e fotografado. Em cada gel, foi colocado o padrão de tamanho molecular "1-kb DNA ladder" (Invitrogen). O gel de agarose para eletroforese foi feito de acordo com Sambrook e Russell (2001).

Digestão do gene *groEL* com enzimas de restrição

Todas as digestões com enzimas de restrição foram realizadas conforme descrito por Barros et al. (2007). A enzima de restrição utilizada para digestão do fragmento do gene *groEL* obtido por PCR foi a endonuclease *Alu*I. Brevemente, para um volume final de 30µL, 500ng (5µL) de DNA amplificado por PCR foram adicionados a uma solução contendo 21,5µL de água deionizada, 3µL de tampão 10X da enzima de restrição (Promega) e 5U (0,5µL) da enzima *Alu*I (Promega). Esta solução foi incubada a 37ºC por 12h.

Uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Hind*III (10 U) (Promega) e *Pvu*II (10 U) (Promega), foram realizadas para diferenciação das espécies *S. chromogenes*, *S. capitis*, e *S. hyicus* por meio do mesmo protocolo. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida não desnaturante a 10% foi preparado conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). O gel foi preparado com o uso de acrilamida (Sigma-Aldrich): bis-acrilamida (Sigma-Aldrich) na proporção 29:1 (%p/v), TBE 1X, persulfato de amônio a 10% e solução TEMED a 1% (Sigma-Aldrich). Em cada tubo contendo as preparações de DNA foram adicionados 1/5 do volume de tampão de amostra e estas foram submetidas à eletroforese em cuba vertical (Amersham Biosciences) a 150 V em tampão TBE 1X por 1h e 40min. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min. Posteriormente, o gel foi observado através do emprego de um transiluminador de luz UV e fotografado. Em cada gel, foi colocado o padrão de tamanho molecular "1kb-DNA ladder" (Invitrogen) e "25 pb-DNA Ladder" (Invitrogen).

Para identificação das espécies de SCN provindas de amostras de leite, as bandas resultantes foram comparadas com fragmentos das cepas padrão de SCN através de

mensurações do tamanho das bandas digeridas em relação às bandas dos padrões de tamanho molecular (SANTOS et al., 2008).

Preparo de amostras para MALDI-TOF MS

Todos os isolados foram descongeladas e submetidas a uma nova cultura microbiológica em meio TSA (*tripticase soy agar*) e incubadas por 24 horas a 37°C. As amostras que apresentaram crescimento no recultivo foram submetidas ao procedimento de preparo que antecede a extração das proteínas ribossomais bacterianas (BARREIRO et al., 2010). Três alçadas (alça de platina de 10µL) do isolado bacteriano foram retiradas da placa de ágar e dissolvidas em 300 µL de água Milli-Q (Millipore Corporation) autoclavada. Após completa dissolução do isolado bacteriano, 900 µL de etanol grau HPLC, foram adicionados à amostra com posterior homogeneização por um minuto. As amostras foram centrifugadas (12.000 x g/2 min) e o sobrenadante foi cuidadosamente removido com uso de pipeta automática. Peletes bacterianos foram deixados secar ao ar em temperatura ambiente por 5 a 10 min.

Protocolo de lise e extração por ácido fórmico/acetonitrila

Um volume de 30 µL de solução de ácido fórmico 70% foi adicionado ao precipitado bacteriano para dissolvê-lo completamente. Em cada amostra foram adicionados 30 µL de acetonitrila (100%), o que produziu um extrato bacteriano final com relação ácido fórmico 70% e acetonitrila 100% de 1:1. Para separar os detritos de células bacterianas (precipitado) das proteínas ribossomais bacterianas dissolvidas no sobrenadante realizou-se nova centrifugação (12.000 x g/2min) (BARREIRO et al., 2010).

Preparação da placa utilizada em MALDI-TOF MS

Uma alíquota de 1 µL dos extratos proteicos bacterianos contidos no sobrenadante foram aplicados em duplicata aos *spots* da placa de MALDI (MSP 384 polished-steel target; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) com uso de uma pipeta automática e deixados para secar em temperatura ambiente. O extrato proteico seco foi recoberto com 1 µL de solução matriz composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico diluído em acetonitrila a 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (BRUKER DALTONICS, 2010). Após pipetagem de ambas as

soluções, a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente (~7 min) para posterior análise no espectrômetro de massas.

Uma alíquota contendo proteínas extraídas de cepas bacterianas de referência (BTS; Bruker) foi utilizada para calibração do equipamento. Um controle positivo (*Escherichia coli*) e controle negativo (ácido fórmico e matriz) foram analisados em cada rodada. A MALDI-TOF MS foi realizada em espectrômetro de massas Autoflex Bruker operado no modo linear e equipado com um laser de azoto 337 nm, por meio do software FlexControl 3.3 (BRUKER DALTONICS, 2010). Os espectros de massa foram recolhidos dentro da gama de massa de 2.000 a 20.000 m/z. Três mil disparos de laser foram acumulados para gerar cada espectro. Os espectros foram analisados pelo software MALDI Biotyper 3.0 em configuração padrão (BRUKER DALTONICS, 2010). Para cada amostra analisada em modo automático, o software Flexcontrol 3.3 gerou um *fingerprint* (conjunto de picos), os quais foram utilizados para coincidir com os da biblioteca referência do software Biotyper 3.0. O resultado foi baseado no algoritmo (escore) lançado pelo software Biotyper 3.0. Escores maiores que 1.7 foram considerados confiáveis para a identificação de gênero, e escores maiores que 2.0 foram considerados confiáveis para identificação em nível de gênero e espécie.

Análise estatística

Para análises dos resultados obtidos por meio da técnica de MALDI-TOF MS, foram considerados identificados em nível de espécie somente os isolados que apresentaram escores ≥2,0. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico S.A.S® versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA), pelo uso do teste McNemar de proporções pareadas. A significância estatística foi estabelecida ao nível de $P<0.05$.

3.3 RESULTADOS

Amostras compostas de leite foram coletadas de 1.242 vacas pertencentes a 21 rebanhos leiteiros. Os agentes mais isolados de vacas com mastite subclínica foram *Corynebacterium* spp. (n=285; 22,98%) e SCN (n=224; 18,06%). Bactérias do gênero *Streptococcus* foram isoladas de 193 vacas (15,56%) enquanto 168 vacas (13,55%) apresentaram isolamento de

bactérias do gênero *Staphylococcus*. Do total de amostras compostas, 264 (21,25%) não apresentaram crescimento e 16 (1,29%) foram excluídas por contaminação (Tabela 1).

Após isolamento microbiológico a partir das amostras compostas, retornou-se às fazendas leiteiras para coleta de amostras de quartos mamários das vacas com isolamento positivo de SCN. Nesta etapa, foram coletadas amostras de 285 vacas (1.140 quartos mamários). Os microrganismos com maior frequência de isolamento pela cultura microbiológica das amostras dos quartos mamários também foram do gênero *Corynebacterium* spp. (30,76%), seguidos de SCN (12,36%), e *Streptococcus* spp. (5,96%). Além destas, 38,91% (n=443) das amostras dos quartos mamários não apresentaram crescimento nos exames microbiológicos e 1,4% (n=16) foram excluídas por contaminação. Os patógenos secundários corresponderam a 70,6% das amostras de leite com cultura positiva em nível de quarto mamário (Tabela 1).

Do total de isolados de quartos mamários recultivados (n=141), 132 (93,62%) apresentaram crescimento no recultivo e foram submetidos à identificação espécie-específica pela metodologia de PCR-RFLP. Destes, 108 isolados foram identificados como bactérias do grupo SCN, com identificação de 12 espécies diferentes. Todas as cepas referência foram corretamente identificadas em nível de espécie.

Tabela 1 – Isolamento de agentes etiológicos da mastite em amostras compostas e por quartos mamários bovinos

Microrganismo	Amostras compostas			Amostras por quartos mamários		
	Frequência Absoluta (n)	Frequência relativa (%)	Culturas positivas (%)	Frequência Absoluta (n)	Frequência relativa (%)	Culturas positivas (%)
Amostras avaliadas	1.242			1.140		
Amostras sem isolamento	264	21,25		443	38,9	
Amostras com isolamento	978	78,75		697	61,1	
Corynebacterium spp.	285	22,98	29,14	351	30,76	50,3
SCN[1]	224	18,06	22,9	141	12,36	20,3
Staphylococcus aureus	168	13,55	17,17	42	3,68	6,0
Outros SCP[2]	29	2,34	2,96	31	2,72	4,45
Streptococcus spp.	193	15,56	19,73	68	5,96	9,75
Arcanobacterium pyogenes	18	1,45	1,84	16	1,40	2,3
Bacillus spp.	34	2,74	3,47	19	1,67	2,72
Enterobactérias	3	0,24	0,3	3	0,26	0,43
Leveduras	5	0,40	0,5	3	0,26	0,43
Nocardia spp.	1	0,08	0,1	4	0,35	0,57
Prothoteca spp.	2	0,16	0,2	3	0,26	0,43
Contaminação[3]	16	1,29	1,63	16	1,4	2,3
Grupo de patógenos[4]						
Patógenos primários	390	31,4	39,9	141	12,35	20,3
Patógenos secundários	509	41	52	492	43,12	70,6

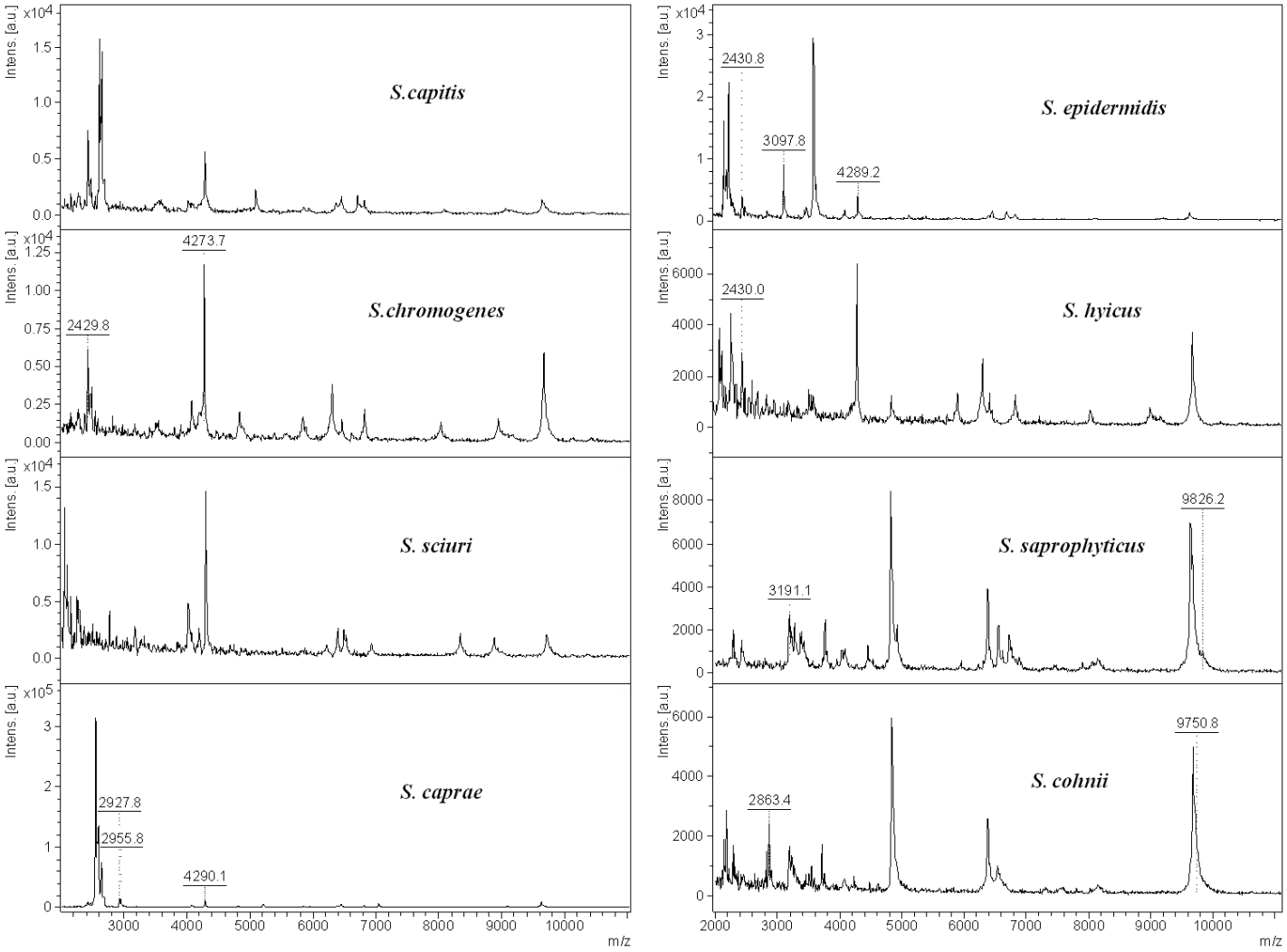
[1]*Staphylococcus* coagulase negativa. [2]*Staphylococcus* coagulase positiva. [3]Culturas microbiológicas com crescimento de mais de um microrganismo. [4]Patógenos primários= *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; Patógenos secundários= *Staphylococcus* coagulase-negativa e *Corynebacterium* spp.

Staphylococcus chromogenes foi a espécie mais predominante (n=80; 74,07%) entre os isolados de SCN, seguida de *S. saprophyticus* (n=6; 5,55%) e *S. haemolyticus* (n=5; 4,63%). Três isolados foram identificados como *S. aureus* coagulase negativa, os quais foram submetidos à nova prova de produção de coagulase para certificação fenotípica. Todos os três isolados de *S. aureus* apresentaram reação negativa neste teste. Outros SCN identificados pela PCR-RFLP foram *S. simulans* (n=4), *S. xylosus* (n=30), *S. capitis* (n=2), *S. epidermidis* (n=2), *S. sciuri* (n=1), *S. cohnii* (n=1), *S. hyicus* (n=1) (Tabela 2).

Dos 33 isolados não identificados pela metodologia de PCR-RFLP, 24 apresentaram crescimento no recultivo. Nove amostras não apresentaram crescimento durante 24 horas de incubação e três amostras apresentaram mais de um agente e foram consideradas contaminadas (Tabela 2).

As cepas de referência (ATCC; n=14) e os isolados de quartos mamários (n=132) com ausência de contaminação no recultivo foram submetidos à análise de MALDI-TOF MS. Do total de cepas isoladas de quartos mamários, 87,88% (n=116) foram identificadas com escore ≥2,0. Um total de 5,30% (n=7) apresentou escore entre 1,7 e 1,99, e 6,82% (n=9) dos isolados não foram identificados devido ao escore ter sido menor que 1,7. Para as amostras com escore ≥2,0, o software Biotyper 3.0 não sugeriu outro microrganismo como segunda opção. Todas as cepas de referência (n=13) identificadas pela metodologia de PCR-RFLP apresentaram equivalência de diagnóstico com a metodologia de MALDI-TOF MS (Figura 1).

Figura 1 – Espectros de MALDI-TOF MS das proteínas ribossomais das cepas de referência (ATCC) utilizadas no estudo



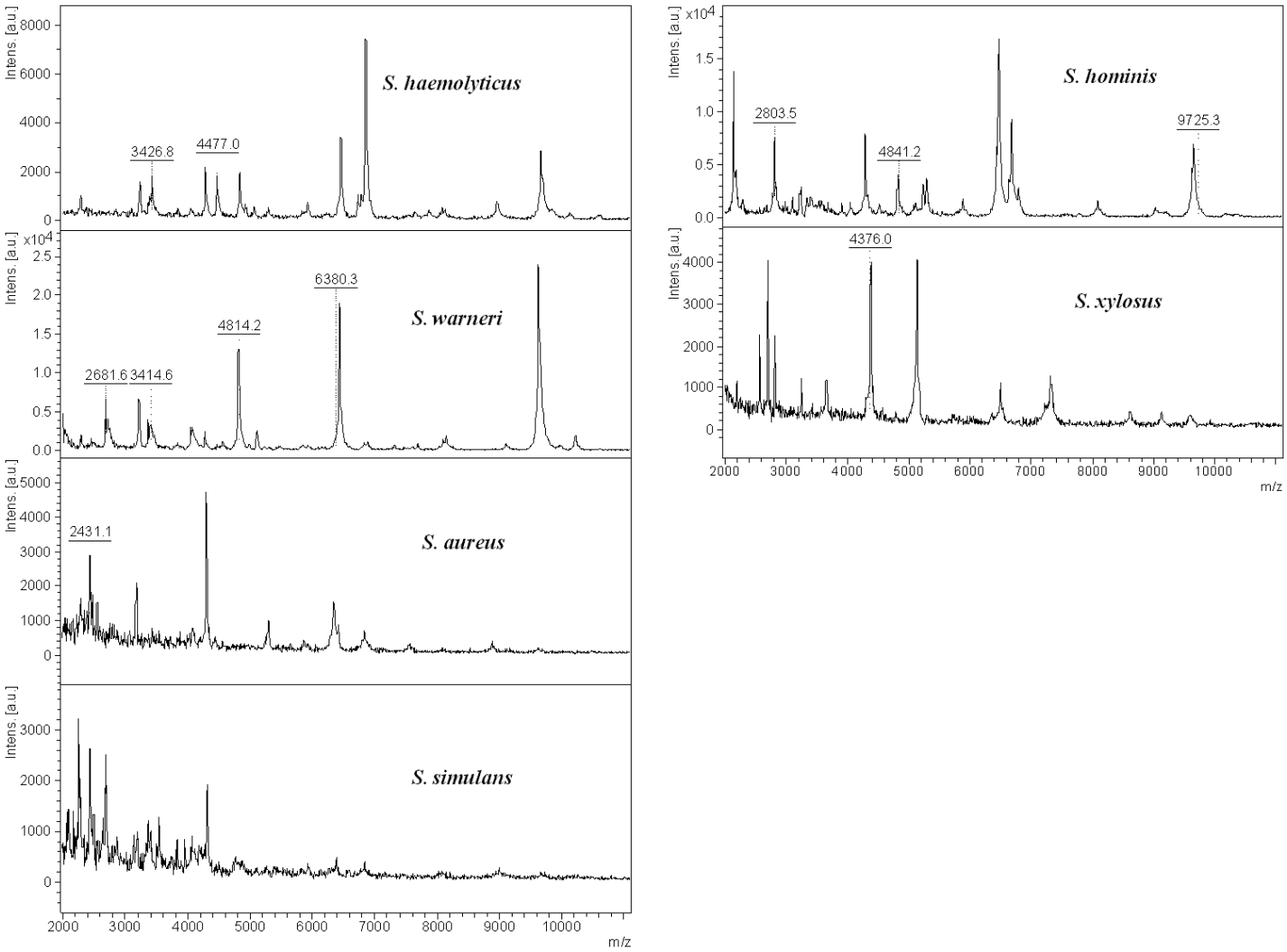

S. haemolyticus
3426.8
4477.0
S. warneri
2681.6
3414.6
4814.2
6380.3
S. aureus
2431.1
S. simulans
S. hominis
2803.5
4841.2
9725.3
S. xylosus
4376.0
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z

Tabela 2 – Identificação de isolados de *Staphylococcus* spp. por PCR-RFLP *versus* MALDI-TOF MS (Continua)

PCR-RFLP	**MALDI TOF-MS**	**Escore**
Isolados (n)	**Isolados (n)**	**MALDI TOF-MS**
Bactérias identificadas como *Staphylococcus* spp.		
Staphylococccus chromogenes (80)	*Staphylococccus chromogenes* (80)	≥2,0
Staphylococcus saprophyticus (6)	*Staphylococcus saprophyticus* (2)	≥2,0
	Staphylococcus saprophyticus (1)	≥1,7 e <2,0
	Staphylococcus aureus (2)	≥1,7 e <2,0
	Staphylococcus hominis(1)	≥1,7 e <2,0
Staphylococcus haemolyticus (5)	*Staphylococcus haemolyticus* (4)	≥2,0
	Staphylococcus haemolyticus (1)	≥1,7 e <2,0
Staphylococcus simulans (4)	*Staphylococcus simulans* (4)	≥2,0
Staphylococcus xylosus (3)	*Staphylococcus xylosus* (3)	≥2,0
Staphylococcus capitis (2)	*Staphylococcus capitis* (2)	≥2,0
Staphylococcus epidermidis (2)	*Staphylococcus epidermidis* (2)	≥2,0
Staphylococcus sciuri (1)	*Staphylococcus sciuri* (1)	≥2,0
Staphylococcus cohnii (1)	*Staphylococcus cohnii* (1)	≥2,0
Staphylococcus hyicus (1)	*Staphylococcus hyicus* (1)	≥2,0
Staphylococcus aureus (3)	*Staphylococcus aureus* (3)	≥2,0
Total de identificação: 108 amostras (100%)	Total de identificação: 103 (95,37%)	≥2,0
Amostras com crescimento não identificadas (24)	*Arthrobacter gandavensis* (1)	≥2,0
	Brachybacterium faecium (2)	≥2,0
	Enterococcus faecalis (1)	≥2,0

Tabela 2 (continuação) – Identificação de isolados de *Staphylococcus* spp. por PCR-RFLP *versus* MALDI-TOF MS. (Conclusão)

PCR-RFLP Isolados (n)	**MALDI TOF-MS Isolados (n)**	**Escore MALDI TOF-MS**
Amostras com crescimento não identificadas (24)	*Jonesia denitrificans* (1)	≥2,0
	Lactobacilus plantarum (1)	≥1,7 e <2,0
	Microbacterium arborescens (1)	≥1,7 e <2,0
	Micrococcus luteus (2)	≥2,0
	Streptococcus agalactiae (1)	≥2,0
	Streptococcus dysgalactiae (2)	≥2,0
	Streptococcus sanguinis(1)	≥2,0
	Streptococcus sobrinus (1)	≥2,0
	Streptococcus uberis (1)	≥2,0
	Sem identificação (9)	<1,7
Amostras sem crescimento no recultivo (7)		
Amostras contaminadas (2)		

Dos 108 isolados de SCN identificados pela metodologia de PCR-RFLP, 103 (95,37%) foram identificados em nível de espécie pela MALDI-TOF MS (escore ≥2,0) com o mesmo agente. Não houve diferença significativa (*P*=0,073) entre as duas metodologias de identificação quando consideradas as amostras identificadas como SCN. Dois isolados (1,85%) apresentaram equivalência de diagnóstico entre as metodologias, porém apresentaram escores entre 1,7 e 1,99, o que caracteriza a provável identificação do gênero; e três isolados (2,78%) não apresentaram equivalência de diagnóstico entre as duas metodologias, mas apresentaram escores entre 1,7 e 1,99, o que os identifica como espécies do gênero *Staphylococcus* (Tabela 2).

Dos 105 isolado7s em que houve equivalência de diagnóstico entre as duas metodologias, 103 (98,09%) apresentaram escore ≥2,0 e apenas dois isolados apresentaram escore entre 1,7 e 1,99. Todos os isolados de SCN em que não houve similaridade de identificação entre as metodologias (n=3) foram identificados por PCR-RFLP como *S. saprophyticus*. Os três isolados de *S. aureus* coagulase negativa identificados por PCR-RFLP tiveram a diagnóstico confirmado pela MALDI-TOF MS com escore ≥2,0 (Tabela 2).

Dos 24 isolados com crescimento na reinoculação e que não foram identificados pela metodologia de PCR-RFLP, 15 (62,5%) foram identificados pela MALDI-TOF MS. Dos isolados identificados pela MALDI-TOF MS, 13 apresentaram escores ≥2,0, e dois apresentaram escores entre 1,7 e 1,99. Nove isolados (37,5%) não foram identificados por apresentarem escore <1,7.

Treze espécies de *Staphylococcus* spp. foram identificadas pela MALDI-TOF MS. *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie de SCN mais isolada das amostras de leite de quartos mamários com mastite. Quando foram consideradas apenas as amostras com escore ≥2,0 (n=103), *S. chromogenes* representou 77,67% (n=80) dos isolados de SCN. Outras espécies de *Staphylococcus* spp. identificadas pela MALDI-TOF MS foram *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. hyicus*, *S. hominis* (Tabela 2).

3.4 DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre as duas metodologias de identificação microbiológica quando consideradas as amostras isoladas como SCN. A metodologia de MALDI-TOF MS apresentou taxa de identificação de 95,37% para os isolados de SCN identificados em nível de espécie (escore>2,0) quando comparado ao percentual de identificação apresentado pela técnica PCR-RFLP.

O diagnóstico da mastite causada por SCN é dificultado devido a grande variedade de espécies com potencial em causar IIM (THORBERG et al., 2009). Outro limitante relacionado à identificação de SCN em nível de espécie é a carência de métodos simples e rápidos, e que de forma confiável possam discriminar as espécies deste grupo de microrganismos. Com base nos resultados observados neste estudo, o uso da técnica de MALDI-TOF MS pode ser uma alternativa rápida e precisa no diagnóstico espécie-específico da mastite causada por SCN. No estudo realizado por Matsuda et al. (2012), após a cultura microbiológica que requer em média 1 dia, a preparação da amostra pela extração com ácido fórmico e o procedimento de análise pela MALDI-TOF MS levaram 180 minutos para que fossem analisadas 24 cepas em duplicata (48 amostras). O tempo médio requerido para identificação microbiológica de uma cepa bacteriana neste mesmo estudo foi de apenas 7,5 minutos.

Metodologias baseadas em procedimentos de análise fenotípica ou genotípica apresentam algum tipo de limitação. Métodos fenotípicos como plataformas miniaturizadas foram considerados imprecisos na diferenciação entre espécies de SCN de origem animal (BES et al., 2000; ZADOKS; WATTS, 2009). Várias metodologias baseadas em microbiologia molecular estão sendo empregadas na identificação de espécies de SCN (SANTOS et al., 2008; CAPURRO et al., 2009; PIESSENS et al., 2010), porém, em sua maioria, são de difícil realização, onerosos e demorados. Além disso, erros de identificação foram observados com o uso de técnicas genotípicas, mesmo em análises das cepas de referência (LOONEN et al., 2012).

A taxa de identificação de SCN observada no presente estudo (95,37%) foi próxima da relatada por outros autores (99,3%) que também utilizaram a técnica de MALDI-TOF MS para identificação em nível de espécie a partir de amostras da clínica médica de humanos (DUBOIS et al., 2010; SPANU et al., 2011). Entretanto, foi superior ao resultado descrito por Matsuda et al. (2012), os quais observaram taxa de

identificação em nível de espécie de SCN de 75,8% ao utilizar técnica de MALDI-TOF MS após extração das proteínas ribossomais com ácido fórmico.

Um recente estudo buscou determinar o método mais preciso disponível atualmente para identificação de *Staphylococcus* spp. (LOONEN et al., 2012). Cinco metodologias de identificação foram comparadas: Vitek2 (bioMérieux), API Staph ID32 (bioMérieux), sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (MicroSeq; Applied Biosystems), sequenciamento parcial do gene *tuf* e MALDI-TOF MS (BRUKER DALTONICS). Os resultados de MALDI-TOF MS obtidos por Loonen et al. (2012) indicaram maior taxa de identificação (99,3%) de espécies de SCN, comparado com API Staph ID32 (85,9%), Vitek2 (92,3%), sequenciamento do gene 16S rRNA (70,4%) e sequenciamento do gene *tuf* (93%). A taxa de identificação de SCN por meio de MALDI-TOF MS observada no presente estudo foi similar à observada com o uso de métodos genotípicos atuais, o que sugere o uso desta técnica como alternativa no diagnóstico da mastite bovina em nível de espécie.

Entretanto, a metodologia de MALDI-TOF MS apresenta algumas limitações. A identificação dos microrganismos só é possível se o espectro referente à cepa de interesse estiver caracterizado no banco de dados do software Biotyper. Além disso, os espectros gerados pelas cepas bacterianas devem ser cuidadosamente caracterizados pelo sequenciamento específico, e a partir de regiões informativas dos genes em questão. Adicionalmente, calibrações do equipamento e a seleção de padrões internos são indispensáveis quando se pretende a caracterização intraespecífica das bactérias (BENAGLI et al., 2011). Outra limitação que pode ser observada no uso da MALDI-TOF MS é a dificuldade de identificação de culturas mistas (MARINACH-PATRICE et al., 2010). O alto custo para aquisição do equipamento de análise também é um fator que pode limitar o uso desta técnica em nível comercial.

Segundo os critérios de confiabilidade de diagnóstico propostos para identificação de *Staphylococcus* spp., o escore dos espectros analisados por MALDI-TOF MS deve ser ≥2 (LOONEN et al., 2012). Escores maiores que 1,7 são considerados confiáveis para a provável identificação de gênero, e escores maiores ou iguais a 2,0 são considerados confiáveis para a identificação em nível de espécie. Neste estudo, quando considerados somente os isolados com escore ≥2,0, houve equivalência de identificação em 98,09% das amostras ao comparar as metodologias de MALDI-TOF MS e PCR-RFLP. Segundo Loonen et al. (2012), baseado em estudos de identificação microbiológica, as taxas de identificação de espécies de *Staphylococcus* cultivadas em

placas de ágar e posteriormente analisadas por MALDI-TOF MS variaram de 74,2 a 99,3% (LOONEN et al., 2012). A variabilidade das taxas de identificação entre os diferentes estudos pode ser explicada por diferenças nas condições de crescimento, preparação de amostras, números de cepas de referência, versão do software Biotyper, e delineamento do estudo (BENAGLI et al., 2011).

Todos os isolados de SCN em que não houve similaridade de identificação entre as metodologias (n=3) foram identificados por PCR-RFLP como *S. saprophyticus*. Nas análises por MALDI-TOF MS estas mesmas amostras apresentaram escores entre 1,7 e 1,99, o que determina um nível de confiabilidade para identificação de gênero. Adicionalmente, a metodologia de extração padrão com uso de ácido fórmico pode ter uma taxa de identificação inferior para algumas espécies de *Staphylococcus* quando comparada a outros métodos de extração. Um estudo avaliou três formas de preparo de amostras para análise de identificação por MALDI-TOF MS (extração padrão com uso de ácido fórmico, extração direta em placa de MALDI e identificação da colônia direta em placa) (MATSUDA et al., 2012). O método de extração em placa foi o mais preciso para a identificação de *Staphylococcus* spp, enquanto falhas de identificação das espécies *S. caprae* e *S. saprophyticus* foram observadas quando utilizado o método de extração com ácido fórmico.

A metodologia de PCR-RFLP identificou 81,82% (n=108) das amostras com crescimento no recultivo como *Staphylococcus* spp. A escolha pela identificação das espécies de SCN pela metodologia de PCR-RFLP como método padrão de comparação com a MALDI-TOF MS foi baseada na alta sensibilidade e especificidade do método relatado em estudos de identificação de *Staphylococcus* spp. Barros et al. (2007) compararam a metodologia de PCR-RFLP com a metodologia de referência baseada em provas bioquímicas e relataram 100% de concordância entre as técnicas de identificação microbiológica em amostras provindas da clínica médica de humanos. De forma similar aos resultados descritos no estudo anterior, Santos et al. (2008) relataram que a técnica de PCR-RFLP com sequenciamento parcial do gene *groEL* foi capaz de identificar 100% da espécies de SCN causadoras de mastite identificadas por provas bioquímicas convencionais. No entanto a metodologia de PCR-RFLP com sequenciamento parcial do gene *groEL* diferencia apenas bactérias do gênero *Staphylococcus*, fato que justifica a não identificação de 24 amostras que apresentaram crescimento no recultivo em placas.

Do total de 24 amostras não identificadas pela PCR-RFLP, 15 (62,5%) foram identificados pela metodologia de MALDI-TOF MS como microrganismos que não fazem parte do gênero *Staphylococcus*. Algumas possíveis causas da não identificação pela técnica de PCR-RFLP são: a) contaminação ou infecção mista com prevalência de determinadas espécies bacterianas no recultivo das amostras; b) extração mais efetiva de proteínas ribossomais de determinadas espécies bacterianas; c) falha no teste de catalase durante a etapa microbiológica de diferenciação entre *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.; d) falhas na identificação morfológica durante a microscopia devido à semelhança entre as formas cocóides para os isolados identificados como *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis* comparados com o SCN.

Nove amostras apresentaram escores <1,7 e não foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS. Algumas possíveis causas da não identificação pela metodologia de espectrometria de massas são: a) as amostras apresentaram excelentes espectros para o padrão de identificação, o que demonstra o sucesso na extração de proteínas ribossomais, porém os espectros encontrados não se equivalem aos do banco de dados do software Biotyper 3.0; e b) ter isolado mais de um agente da glândula mamária, o que acontece em casos de infecção mista, ou contaminação, com provável formação de espectros devido à extração de proteínas dos dois patógenos. Falhas de identificação também foram relatadas no estudo realizado por Alatoom et al. (2011), em que 5% das amostras não foram identificadas pela metodologia de MALDI-TOF-MS (escore <1,7) com a mesma metodologia de extração utilizada neste estudo.

Os resultados do presente estudo indicaram maior frequência de isolamento de patógenos secundários da mastite que de patógenos primários. Os patógenos secundários representaram 70,6% das culturas positivas das amostras de leite de quartos mamários. Resultados similares foram observados em estudo realizado no Brasil, em que alta frequência (67,6%) de quartos mamários com cultura positiva de patógenos secundários foi isolada de amostras de leite (BRITO et al., 1999). Atualmente, em países onde os agentes primários da mastite (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e coliformes) são menos prevalentes, os agentes secundários têm se tornado os microrganismos emergentes como causa de infecções na glândula mamária (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Além disso, a alta prevalência de patógenos secundários da mastite em rebanhos leiteiros, em especial, de SCN e *Corynebacterium* spp., pode estar relacionada com a deficiência na prática de imersão dos tetos em solução desinfetante (HALTIA et al., 2006; QUIRK et al., 2012). Com base na mudança

de perfil de agentes causadores de mastite, estudos devem ser direcionados para avaliar o efeito dos patógenos secundários sobre a glândula mamária, para que os mesmos sejam mais bem caracterizados e medidas mais específicas de controle possam ser desenvolvidas para redução da prevalência em rebanhos leiteiros.

Doze espécies de SCN foram isoladas de amostras de quartos mamários, o que confirma a variedade de espécies de SCN com potencial em causar IIM em vacas leiteiras. Segundo Capurro et al. (2009) dezesseis espécies de SCN foram isoladas de amostras de leite de vacas com mastite. A espécie de SCN mais isolada dos quartos mamários com infecção causada por SCN no presente estudo foi *S. chromogenes* (74,07%). Outros estudos descreveram que esta espécie é uma das mais prevalentes em amostras de leite de vacas com mastite causada por SCN (DE VLIEGHER et al., 2003; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004; TAPONEN et al., 2006; DUFOUR et al., 2012; PIESSENS et al., 2012), porém, não com a frequência de isolamento observada no presente estudo. A alta frequência de isolamento de *S. chromogenes* observada neste estudo pode estar relacionada à prevalência desta espécie nos rebanhos avaliados. Além disso, um estudo demonstrou que *S. chromogenes* tem como reservatório principal a glândula mamária das vacas, o que é característica de patógenos contagiosos (PIESSENS et al., 2011). No mesmo estudo, as espécies *S. chromogenes* (78,8%) e *S. epidermidis* (57,1%) foram predominantemente isolados do leite, e menos isolados das amostras coletadas do ambiente. Adicionalmente, outros estudos sugerem que *S. chromogenes* apresenta alta resistência aos antimicrobianos (PATE et al., 2012), com potencial em causar persistência de infecção e aumento da CCS de forma semelhante ao *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). A maior afinidade pela glândula mamária somada com o potencial de persistência de infecção e resistência a antibióticos são fatores que podem justificar a alta prevalência de *S. chromogenes* isolados de amostras de leite no presente estudo.

Apenas 28 (25,93%) isolados foram identificados entre as outras 11 espécies de SCN identificadas nas análises de PCR-RFLP. Todas as espécies de SCN identificadas com menor frequência das amostras de quartos mamários no presente estudo, já haviam sido isoladas de amostras de leite de vacas com mastite em outros estudos (FOX; BESSER; JACKSON, 1996; PARK et al., 2011; PIESSENS et al., 2011). Com base na prova de coagulase, três isolados bacterianos foram identificados como *S. aureus* coagulase negativa. Fox et al. (1996) também identificaram uma variante de *S. aureus* com reação negativa na prova de coagulase e sugeriram que a capacidade dos

Staphylococcus em coagular o plasma sanguíneo é um fator de virulência que pode causar aumento na CCS de vacas com IIM. Por pertencer ao grupo de bactérias do gênero *Staphylococcus* e por apresentar reação negativa na prova de coagulase, os isolados identificados como *S. aureus* coagulase negativa no presente estudo foram considerados como microrganismos pertencentes ao grupo de SCN.

Os resultados deste estudo sugerem que a técnica de MALDI-TOF MS é um método sensível para identificação microbiológica de espécies de SCN causadoras de mastite subclínica. Espécies de SCN, em especial o *S. chromogenes*, podem apresentar perfil contagioso e patogenicidade semelhantes ao *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011), fato que aumenta a importância de um diagnóstico rápido e correto das IIM causadas por esses agentes. Em razão da dificuldade de diagnóstico devida à grande variedade de espécies de SCN causadoras de mastite, a MALDI-TOF MS é uma ferramenta que pode trazer facilidade, precisão e rapidez de diagnóstico.

3.5 CONCLUSÃO

A técnica de MALDI-TOF MS associada com o MALDI Biotyper 3.0 é uma metodologia de alta sensibilidade no diagnóstico das espécies de SCN isoladas de vacas com mastite. A rapidez dos resultados, juntamente com a simplicidade do procedimento de análise, torna este método adequado para o uso na rotina de diagnóstico de SCN causadores de mastite. Com base na prevalência de SCN em amostras de leite, *S. chromogenes* foi a espécie com maior frequência de isolamento.

4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS COM MASTITE CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA

RESUMO

Nas últimas décadas, programas específicos de prevenção de mastite têm resultado em grandes avanços no controle de infecções intramamárias (IIM) causadas por patógenos principais. Concomitantemente, nestes mesmos rebanhos, observa-se aumento no diagnóstico de infecções subclínicas causadas por patógenos secundários, em especial por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de IIM subclínicas causadas por SCN sobre a produção, a composição e a contagem de células somáticas (CCS) por meio da comparação de quartos mamários contralaterais em vacas leiteiras. Amostras de leite foram coletadas de 1.242 vacas distribuídas em 21 rebanhos leiteiros. As coletas foram realizadas em duas etapas: na primeira, realizou-se coleta asséptica de amostras compostas para identificação dos agentes causadores de mastite; e na segunda, para as vacas com isolamento de SCN, a produção de leite foi mensurada e amostras foram coletadas por quarto mamário para confirmação do diagnóstico microbiológico e avaliação da composição e CCS. Os isolados de SCN foram diferenciados genotipicamente pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (RFLP). Um total de 108 quartos mamários foram identificados em nível de espécie pela técnica de PCR-RFLP. Destes, foram selecionados 41 pares de quartos mamários contralaterais com e sem IIM causada por SCN. Quartos mamários com IIM causada por SCN apresentaram CCS mais altas (496,99 x 10^3 células/mL) que os quartos mamários contralaterais sadios (160,79 x 10^3 células/mL). A IIM causada por SCN não afetou a produção de leite e as concentrações de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado. Em conclusão, a mastite causada por SCN aumenta a CCS, porém não altera a produção e composição do leite.

Palavras-chave: Produção e composição do leite. Mastite subclínica. *Staphylococcus* coagulase negativa.

ABSTRACT

In the last decades, specific mastitis prevention programs have resulted in great advances in controlling intramammary infections (IMI) caused by major pathogens. Concurrently, there was an increase in the diagnosis of subclinical infections caused by minor pathogens, especially coagulase negative staphylococci (CNS). The aim of this study was to evaluate the effect of subclinical IMI caused by CNS on the milk yield and composition and somatic cell count (SCC) by comparing the contralateral mammary quarters of dairy cows. Milk samples were collected from 1,242 cows distributed in 21 dairy herds. Milk samples were collected in two visits to the farm: first, composite milk samples were aseptically collected for identification of mastitis causative pathogens; and the second, the production was measured and milk samples were collected at mammary quarter level for the cows with isolation of SCN to confirm the diagnosis and for analysis of milk composition and SCC. The CNS isolates were genotypically differentiated by polymerase chain reaction (PCR) associated with restriction fragment length polymorphism assays (RFLP). A total of 108 mammary quarters were identified by PCR-RFLP. Of these, 41 pairs of contralateral mammary quarters both with and without IIM caused by SCN were evaluated. Mammary quarters infected with CNS presented higher SCC (496.99 x 10^3 cells / mL) than contralateral healthy mammary quarters (160.79 x 10^3 cells / mL). The IMI caused by CNS did not affect the milk yield and the concentrations of fat, protein, casein, lactose, total solids and solids not fat. In conclusion, the mastitis caused by CNS increases the SCC, but does not affect the milk yield and composition.

Keywords: Milk yield and composition. Subclinical mastitis. Coagulase negative staphylococci.

4.1 INTRODUÇÃO

A mastite subclínica é a forma de apresentação de infecção intramamária (IIM) onde se concentram as principais perdas econômicas dentre as doenças que acometem as vacas leiteiras. Nas últimas décadas, programas específicos de prevenção de mastite têm resultado em redução de IIM causadas por patógenos principais e consequente

aumento no diagnóstico de infecções subclínicas causadas por patógenos secundários, em especial, causadas por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Atualmente, SCN é considerado uma das principais causas de mastite bovina (TAPONEN et al., 2006; THORBERG et al., 2009).

O efeito das IIM causadas por SCN sobre a produção e composição do leite ainda apresenta resultados inconclusivos. Alguns estudos classificaram estes agentes como causa importante da mastite bovina e com potencial em reduzir a produção de leite (TIMMS; SCHULTZ, 1987; GROHN et al., 2004). Por outro lado, outros estudos classificaram tais microrganismos como patógenos secundários do úbere, sem correlação com a produção e qualidade do leite (PARADIS et al., 2010). Adicionalmente, alguns estudos sugerem efeito protetor de SCN na glândula mamária frente a agentes primários causadores de mastite, resultando em aumento da produção leiteira em vacas infectadas por SCN (SCHUKKEN, Y. H. et al., 2009; REYHER et al., 2012).

A maioria dos estudos que avaliaram o efeito da IIM sobre a produção e composição do leite considerou SCN como um grupo de bactérias, no entanto, cerca de dezesseis espécies de SCN foram isoladas em amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica (CAPURRO et al., 2009). Uma razão para isso é que IIM causadas por SCN comumente permanecem na forma subclínica e geralmente causam apenas aumentos de grau leve a moderado na CCS comparadas com as IIM causadas por patógenos maiores. Algumas espécies de SCN como *S. chromogenes* e *S. epidermidis* são mais adaptadas à glândula mamária e utilizam este órgão como reservatório e fonte de infecção (PIESSENS et al., 2012). Adicionalmente, *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* apresentaram CCS similares à observada em IIM causadas por *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). A grande heterogeneidade epidemiológica dentre as espécies de SCN denota a importância de identificação microbiológica deste grupo de bactérias em nível de espécie.

A redução nos componentes e produção de leite pode ser subestimada quando vacas infectadas são comparadas com grupos de vacas sadias e não com sua potencial produção antecedente à infecção (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram o efeito da IIM causada por SCN sobre a produção e composição do leite por meio da comparação de quartos contralaterais sadios e infectados. Este método comparativo pode minimizar a variação que ocorre

entre os quartos mamários e que podem ser fatores de confundimento, tais como, sistemas de manejo e desafio ambiental.

Portanto, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar o efeito de IIMs subclínicas causadas por SCN, após identificação em nível de espécie sobre a produção e CCS de quartos mamários bovinos por meio da comparação de quartos contralaterais infectados e sadios; (2) determinar o efeito da IIM causada por SCN sobre o teor de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total, extrato seco desengordurado do leite e contagem de células somáticas (CCS).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de rebanhos e vacas e coleta de amostras

Vinte e um rebanhos leiteiros foram selecionados com base na proximidade do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP/FMVZ-USP), Pirassununga-SP. Como critério de inclusão, todas as propriedades deveriam dispor de equipamento de ordenha mecanizada e proceder o manejo de ordenha com as seguintes práticas de controle e monitoramento de mastite: descarte dos primeiros jatos para verificação de mastite clínica, imersão dos tetos em solução desinfetante e secagem dos tetos com toalhas descartáveis, seguido de nova imersão em solução desinfetante ao final da ordenha. Todos os rebanhos deveriam utilizar a terapia da vaca seca e tratamento imediato de mastite clínica.

A coleta de amostras foi realizada em duas etapas. Na primeira, amostras compostas de leite (dos quatro quartos mamários) foram coletadas assepticamente de cada vaca para identificação dos agentes causadores de mastite. O procedimento para coleta de amostras assépticas para cultura microbiológica foi realizado da seguinte forma: precedendo a ordenha, os tetos foram imersos em solução de iodo 0,5%, e decorridos 30 segundos, foram secos com papel-toalha descartável; em seguida, os três primeiros jatos foram desprezados em caneca de fundo preto. Cada amostra foi coletada diretamente em tubo estéril, e imediatamente acondicionada em caixa isotérmica sob temperatura de 4-7 ºC.

Na segunda etapa, em um período inferior a 15 dias e sempre na ordenha da tarde, a produção total de leite de cada quarto mamário das vacas previamente diagnosticadas com IIM causadas por SCN foi mensurada e amostras foram coletadas para análises de composição e cultura microbiológica. Os quartos mamários foram ordenhados separadamente por meio de um equipamento de balde ao pé (Intermaq Sistemas de Ordenha, Porto Alegre, Brasil) acoplado à linha de vácuo do sistema de ordenha mecanizada. O equipamento foi composto de um pulsador próprio e um conjunto de quatro teteiras conectadas a mangueiras de silicone e válvulas individuais de liberação de vácuo. Este sistema permitiu a canalização do leite de cada quarto mamário até um latão de aço inoxidável com quatro compartimentos com capacidade de 5 litros cada (Figura 2).

A produção de leite da ordenha individual e completa dos quartos mamários de cada vaca foi estimada por meio de uma régua graduada com base no volume pré-conhecido de cada compartimento. Após registro do volume de leite, o mesmo foi homogeneizado e 40 mL foram coletados e armazenados em tubos plásticos com conservante Bronopol® na concentração de 0,05g por 100 mL de leite segundo a International Dairy Federation (IDF-FIL, 1995). Em seguida, as amostras de leite foram refrigeradas (4-7°C) para realização das análises de composição e CCS (Figura 2).

Para cálculo de produção de leite, obtidos em mililitros (mL), os dados foram convertidos em gramas por meio da fórmula de Fleishmann (PEREIRA et al., 2001):

$$EST\% = 1,2G + 2,655[(100D-100)/D]$$

Onde: EST% = % de extrato seco total; G = % de gordura; D = densidade. Os resultados de produção de leite foram corrigidos para gordura (3,5%) segundo a equação proposta por Sklan et al. (1992). Para calcular os dados de produção de leite em gramas, levou-se em consideração que a densidade (D) é igual ao quociente entre a massa e o volume.

Figura 2 - Fluxo de coleta de amostras compostas e por quartos mamários para isolamento de SCN, composição e CCS

Definição de infecção intramamária

Os quartos mamários bovinos foram considerados infectados quando as amostras de leite apresentavam: (a) isolamento de microrganismo pela cultura microbiológica com pelo menos 10 colônias (1,000 cfu/mL); e, (b) duas confirmações consecutivas do microrganismo, em prazo inferior a 15 dias, sendo um isolamento baseado em amostra composta de leite e outro em amostra por quarto mamário (ANDERSEN et al., 2010; DOHOO, I. et al., 2011; DOHOO, I. R. et al., 2011). Por outro lado, as amostras de leite foram diagnosticadas como negativas quando não apresentaram isolamento de microrganismos (em até 72 horas de incubação) nas duas etapas de amostragem e com valores inferiores $200x10^3$células/mL.

O isolamento bacteriano e a identificação pelo método de PCR-RFLP foram realizados de acordo com o item 3.2.

Análises de composição do leite e contagem de células somáticas

A concentração de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total e extrato seco desengordurado foram analisados por absorção infravermelha, utilizando-se de um equipamento analisador MilkoScan™ FT+ (FOSS, 2008) . A CCS foi realizada

por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico (International Organization for Standardization & Dairy Federation, International Satandard – ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:2006), utilizando-se equipamento Fossomatic ™ FC (FOSS, 2008). Os resultados de CCS foram expressos em células somáticas por mililitro de leite (CS/mL).

Análise estatística

Quartos mamários foram considerados as unidades experimentais. Todos os modelos estatísticos foram analisados usando PROC MIXED do SAS® versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Dois conjuntos de dados foram utilizados para a análise estatística:

(1) Para o primeiro conjunto de dados (quartos não-contralaterais) foi utilizado delineamento em blocos casualizados para dados pareados, nos quais foram comparados todos os quartos mamários infectados por SCN com todos os quartos sem isolamento microbiológico. As fazendas e o efeito de metade do úbere (quartos anteriores e posteriores) foram blocados com o objetivo de minimizar a heterogeneidade entre as unidades experimentais:

$$\mathrm{Y} = \mu + [(\mathrm{Xi} - \mathrm{Xii}) / \sqrt[2]{[(\mathrm{si}/\mathrm{ni})^2 + (\mathrm{sii}/\mathrm{nii})^2]}] + e$$

Onde Y é a variável dependente em estudo; Xi é a média da variável em questão dos quartos mamários sadios; Xii é a média da variável em questão dos quartos mamários com IIM causada por SCN; Si é o desvio padrão da variável em questão dos quartos mamários sadios; Sii é o desvio padrão da variável em questão dos quartos mamários com infecção intramamária por SCN; ni é o número de quartos mamários sadios; nii é o número de quartos mamário infectados por SCN**;** e *e* é o erro aleatório atribuído aos fatores de variação. Os valores de Y encontrados foram comparados ao tabelado para verificar a existência de diferença estatística a 5%.

(2) Para o segundo conjunto de dados, os quartos infectados por SCN foram comparados com os quartos mamários contralaterais sem isolamento microbiológico. Para esta análise, foi utilizado delineamento em parcelas subdivididas em faixas (*strip-plot*), em que os quartos anteriores e posteriores foram separados em metades, de modo

que as glândulas contralaterais esquerda e direita foram comparadas dentro de uma mesma metade e dentro de uma mesma vaca, utilizando-se o seguinte modelo misto (SILVA et al., 2008):

$$Y = \mu + \text{IIM} + \text{metade}(\text{IIM} * \text{metade}) + \{[\text{vaca} + (\text{vaca} * \text{metade}) + [\text{IIM} * \text{vaca}(\text{metade})]\} + e$$

Onde Y é a variável dependente em estudo; μ é a média da variável em questão; IIM e metade são os fatores fixos de variação, em que: IIM é a presença ou não de IIM subclínica causada por SCN; e a metade são os tetos contralaterais direito e esquerdo, dentro de uma mesma vaca; IIM*metade é a interação entre os fatores fixos de variação; vaca é o fator de variação aleatório, e *e* é o erro aleatório atribuído aos fatores de variação.

Para remover a heterogeneidade de variâncias, os dados de CCS obtidos foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 ($\log_{10}$CS/mL) para análise estatística, e à função antilogarítmica (CS/mL) para discussão dos resultados.

4.3 RESULTADOS

Prevalência de IIM

Staphylococcus coagulase negativa é formado por um grupo de espécies bacterianas mais isoladas de amostras de leite de vacas com mastite em diversos países (SCHUKKEN, Y. H. et al., 2009). Para avaliar o efeito da mastite causada por esses agentes, amostras compostas foram coletadas de 1.242 vacas. Deste total, 224 (18%) vacas apresentaram isolamento positivo de SCN na cultura microbiológica. Outros microrganismos isolados foram *Corynebacterium* spp. (n=285; 22,9%); *Staphylococcus* coagulase positiva (n=197; 15,8%); *Streptococcus* spp. (n=193; 15,9%); *Arcanobacterium pyogenes* (n=18; 1,4%). Um total de 264 amostras (21,25%) não apresentaram crescimento na cultura microbiológica e 16 amostras (1,29%) foram excluídas por contaminação (Tabela 1, p. 63).

Após cultura microbiológica das amostras compostas de leite, amostras foram coletadas em nível de quarto mamário das vacas com isolamento positivo de SCN para nova cultura microbiológica e análises de composição e CCS. Nesta etapa, as amostras

foram coletadas de 1.140 quartos mamários, dos quais, 141 (12,3%) apresentaram isolamento positivo de SCN pela cultura microbiológica. Do total de amostras coletadas, 444 (38,9%) não apresentaram crescimento e 1,4% (n=16) foram excluídas por contaminação. Outros microrganismos isolados foram *Corynebacterium* spp. (n=351; 30,76%), o qual apresentou maior frequência de isolamento, *Staphylococcus* coagulase positiva (n=73; 6,4%), *Streptococcus* spp. (n=68; 5,9%) e *Arcanobacterium pyogenes* (n=16; 1,45%). Os patógenos secundários corresponderam a 70,6% das amostras com isolamento positivo dos quartos mamários (Tabela 1).

As amostras com isolamento de SCN na cultura microbiológica foram reinoculadas e submetidas à análise de identificação em nível de espécie pela técnica de PCR-RFLP. Das 141 amostras isoladas em nível de quarto mamário, 108 foram identificadas em nível de espécie como SCN. *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie mais prevalente com 74,07% (n=80) dos isolados, seguida de *S. saprophyticus* (5,55%, n=6), *S. haemolyticus* (4,63%, n=5) e *S. simulans* (3,70%, n=4). Outras espécies isoladas com menor frequência foram *S. aureus* coagulase negativa (n=3), *S. xylosus* (n=3), *S. capitis* (n=2), *S. epidermidis* (n=2), *S. cohnii* (n=1), *S. hyicus* (n=1) e *S. sciuri* (n=1) (Tabela 2, p. 67).

Dos 33 isolados sem identificação, 24 apresentaram crescimento no recultivo, mas não foram identificadas pela metodologia de PCR-RFLP. Nove amostras não apresentaram crescimento durante as 24 horas de incubação e três amostras apresentaram mais de um agente e foram consideradas contaminadas.

Produção, composição e CCS

Dois conjuntos de dados foram utilizados para avaliar o efeito da mastite subclínica causada por SCN sobre a produção e composição e CCS do leite. Com base no primeiro conjunto de dados, ao comparar os quartos mamários infectados por SCN (n=108) com todos os quartos sem isolamento microbiológico (n=281), todas as variáveis estudadas sofreram alteração, exceto a produção de gordura (P=0,08) (Tabela 3). Quartos mamários infectados por SCN produziram 311,25 g mais leite que os quartos sem isolamento microbiológico.

Considerando a maior produção de leite dos quartos mamários com cultura positiva de SCN, da mesma forma, os quartos com presença de IIM apresentaram produção maior dos componentes do leite (g/ordenha/quarto). Os quartos com mastite

subclínica causada por SCN apresentaram produções mais altas de proteína (7,32 g; *P*=0,013), caseína (5,38 g; *P*=0,018), lactose (12,37 g; *P*=0,01), sólidos totais (30,23 g; *P*=0,014) e extrato seco desengordurado (23,08 g; *P*=0,007) que as amostras com cultura negativa. Contraditoriamente, quando avaliado o efeito da mastite causada por SCN sobre a concentração (g/Kg) de sólidos no leite, os quartos com isolamento microbiológico apresentaram resultados menores para gordura (2,3g/Kg; *P*=0,05), proteína (1,1 g/Kg; *P*=0,014), caseína (1,0 g/Kg; *P*=0,004), lactose (1,1 g/Kg; *P*=0,0005), sólidos totais (4,3 g/Kg; *P*=0,002) e extrato seco desengordurado (2,2 g/Kg; *P*=0,0003) que os quartos sadios. Em relação à CCS, os quartos mamários com IIM causada por SCN apresentaram 545,8 x10^3céls/mL, enquanto a média dos quartos sadios foi de 70,16 x10^3céls/mL (Tabela 3). Do total de 108 quartos mamários com isolamento de SCN, 68 (62,96%) apresentaram CCS > 200x10^3céls/mL.

Tabela 3 - Efeito da infecção intramamária causada por SCN sobre a produção, composição e a CCS do leite de quartos mamários

Variável	Quartos mamários			
	Infectados	Sadios	EPM[1]	*P*
Produção de leite[2]	2264,52	1953,27	47,01	0,002
PLC 3,5%[3]	2270,12	2019,30	49,96	0,0189
CCS (células/mL) [4]	545,8	70,16	29,23	<0.0001
CCS (LogCS/mL)[5]	2,44	1,7	0,02	<0.0001
	Composição (g/Kg)			
Gordura	35,2	37,5	0,05	0,050
Proteína	30,7	31,8	0,02	0,014
Caseína	23,6	24,6	0,01	0,004
Lactose	44,9	46,0	0,01	0,0005
Sólidos totais	120,7	125,0	0,06	0,002
ESD[6]	85,4	87,6	0,02	0,0003
	Composição (g/ordenha/quarto)			
Gordura	79,5	72,33	1,96	0,083
Proteína	68,28	60,96	1,40	0,013
Caseína	52,59	47,21	1,08	0,018
Lactose	102,77	90,4	2,23	0,010
Sólidos totais	272,73	242,5	5,79	0,014
ESD[6]	193,23	170,15	4,04	0,007

[1]EPM - Erro padrão da média; [2]Produção de leite mensurada em g/ordenha/quarto; [3]PLC – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; [4]CCS – contagem de células somáticas (x 10^3céls/mL); [5]Contagem de células somáticas transformada em logaritmo; [6]ESD - Extrato seco desengordurado.

Um total de 82 quartos mamários foram avaliados no segundo conjunto de dados, de forma que os quartos infectados por SCN (n=41) foram comparados com os quartos mamários contralaterais sem isolamento microbiológico. Não foi observada diferença entre os quartos infectados e os quartos sadios para a produção de leite e os teores e produção (g/ordenha) dos componentes do leite. Quartos com IIM causada por SCN apresentaram CCS mais alta (496,99 x 10^3céls/mL; $P<0.0001$) que os quartos contralaterais sadios (160,79 x 10^3céls/mL) (Tabela 4). Estes resultados sugerem que a avaliação de IIM por meio de quartos contralaterais pode ser mais precisa.

Tabela 4 - Efeito da IIM causada por SCN sobre a produção, composição e CCS no leite de quartos mamários contralaterais

Variável	Quartos mamários			
	Infectados	Sadios	EPM[1]	*P*
Produção de leite[2]	2282,11	2331,17	89,48	0,543
PLC 3,5%[3]	2349,12	2421,71	106,461	0,435
CCS (células/mL)[4]	496,99	160,79	51,52	<0,001
CCS[5] (LogCS/mL)[5]	2,48	1,80	0,07	<.0001
	Composição (g/Kg)			
Gordura	35,9	36,6	0,09	0,161
Proteína	30,2	30,4	0,03	0,552
Caseína	23,2	23,4	0,02	0,561
Lactose	44,9	44,9	0,04	0,904
Sólidos totais	120,9	121,8	0,11	0,213
ESD[6]	84,9	85,1	0,04	0,578
	Composição (g/ordenha/quarto)			
Gordura	83,89	87,05	4,38	0,400
Proteína	68,85	69,98	2,77	0,669
Caseína	53,14	53,98	2,14	0,683
Lactose	103,58	105,63	4,25	0,580
Sólidos totais	12,09	12,18	0,11	0,213
ESD[6]	194,77	198,39	7,81	0,610

[1]EPM - Erro padrão da média; [2]Produção de leite mensurada em g/ordenha/quarto; [3]PLC – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; [4]CCS – contagem de células somáticas (x 10^3céls/mL); [5]Contagem de células somáticas transformada em logaritmo; [6]ESD - Extrato seco desengordurado.

Após identificação microbiológica pela técnica de PCR-RFLP, *S. chromogenes* foi a espécie mais predominante nas amostras de leite identificadas em nível de quarto mamário (Tabela 5). Devido ao número considerável de isolamentos, esta foi a única espécie em que foi possível avaliar o efeito da IIM sobre a produção e composição do leite. Quando comparadas as amostras dos quartos mamários identificadas como *S. chromogenes* (n=31) com os quartos contralaterais, a presença de infecção somente apresentou efeito ($P<0,01$) sobre a CCS. Quartos mamários infectados por *S. chromogenes* apresentaram média de CCS de 452,62 x 10^3céls/mL, enquanto os quartos contralaterais sadios apresentaram média de 166,16 x 10^3céls/mL. Não foi observado efeito da IIM causada por *S. chromogenes* sobre a produção e composição do leite (Tabela 6).

Tabela 5 - Produção, composição do leite e CCS, por espécies de SCN identificadas pela metodologia de PCR-RFLP

Espécies	*n*[1]	Produção de leite[2]	PLC[3] 3,5%	CCS[4]	Composição (g/Kg)					
					Gordura	Proteína	Caseína	Lactose	ST[5]	ESD[6]
Staphylococcus spp.	108	2264,52	2270,12	545,8	35,2	30,7	23,6	44,9	120,7	85,4
S. chromogenes	80	2310,21	2383,29	452,62	36,9	30,2	23,3	44,6	121,6	84,6
S. saprophyticus	6	2384,92	2319,44	262,33	33,5	28,8	22,3	46,2	118,3	84,8
S. haemolyticus	5	1759,17	1990,08	2085,00	45,0	37,1	28,8	45,1	137,1	92,1
S. simulans	4	2363,85	2137,94	607,25	28,5	28,3	21,5	43,9	110,7	82,2
Outros	13	1729,35	1699,31	599,38	34,17	32,56	25,19	45,25	121,91	87,74
S. aureus coag. negativa	3	1703,02	1604,70	523,00	30,8	32,9	25,6	46,4	120,0	89,2
S. xylosus	3	1361,92	1264,92	734,33	30,9	36,1	28,0	45,9	122,8	91,9
S. capitis	2	1049,30	1151,80	1672,50	39,4	32,1	24,8	41,9	123,6	84,2
S. epidermidis	2	2773,86	2909,9	255,0	36,5	27,7	21,6	47,0	121,1	84,5
S. cohnii	1	1081,95	1253,81	295,00	44,7	34,1	26,1	41,8	131,2	86,5
S. hyicus	1	3047,87	2510,30	261,00	24,1	29,1	22,1	44,3	106,6	82,5
S. sciuri	1	1510,52	1595,11	68,00	38,4	33,9	25,9	47,6	129,4	91,0
Quartos sadios	281	1953,27	2019,30	70.16	37,5	31,8	24,6	46,0	125,0	87,6

[1]*n* - Número de observações; [2]Produção de leite mensurada em g/ordenha/quarto; [3]PLC – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; [4]CCS – contagem de células somáticas (x 10^3céls/mL); [5]ST - Sólidos totais; [6]ESD - Extrato seco desengordurado.

Tabela 6 - Efeito da IIM causada por *Staphylococcus chromogenes* sobre a produção, composição e CCS do leite de quartos mamários contralaterais

Variável	Quartos mamários			
	Infectados	Sadios	EPM[1]	*P*
Produção de leite[2]	2310,21	2360,04	107,02	0,560
PLC 3,5%[3]	2424,12	2507,65	125,86	0,478
CCS (células/mL)[4]	452,62	166,16	54,79	0,003
CCS[5] (LogCS/mL)[5]	2,50	1,78	0,07	<0.0001
	Composição (g/Kg)			
Gordura	3,69	3,77	0,11	0,255
Proteína	3,02	3,04	0,03	0,723
Caseína	2,33	2,34	0,02	0,800
Lactose	4,46	4,46	0,04	0,953
Sólidos totais	12,16	12,25	0,13	0,332
ESD[6]	8,46	8,48	0,05	0,721
	Composição (g/ordenha/quarto)			
Gordura	87,25	90,43	5,15	0,460
Proteína	70,37	70,94	3,38	0,838
Caseína	54,30	54,64	2,61	0,876
Lactose	104,33	106,14	5,09	0,653
Sólidos totais	284,56	290,61	14,11	0,602
ESD[6]	197,31	200,14	9,41	0,709

[1]EPM - Erro padrão da média; [2]Produção de leite mensurada em g/ordenha/quarto; [3]PLC – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; [4]CCS – contagem de células somáticas (x 10^3céls/mL); [5]Contagem de células somáticas transformada em logaritmo; [6]ESD - Extrato seco desengordurado.

4.4 DISCUSSÃO

Prevalência de IIM

Staphylococcus coagulase negativa representaram 12,36% das amostras coletadas de quartos mamários e foram o segundo grupo de agentes com maior frequência de isolamento neste estudo, atrás apenas do *Corynebacterium* spp. (30,76%). Juntos, *Corynebacterium* spp. e SCN representaram 70,6% das culturas positivas de quartos mamários. Alta prevalência de patógenos secundários já foi relatada no Brasil, onde SCN e *Corynebacterium* spp. foram responsáveis por 67,6% dos isolados de quartos mamários (BRITO et al., 1999). Em estudo realizado na Bélgica, espécies de SCN e *Corynebacterium* spp. representaram juntos 81,1% dos isolamentos microbiológicos (SUPRÉ et al., 2011). Nas últimas décadas, programas de controle e prevenção resultaram na redução da prevalência dos patógenos primários como *S.*

aureus, Streptococcus spp. e coliformes (PIESSENS et al., 2011). Este fato pode ter influenciado na emergência de patógenos secundários em rebanhos leiteiros.

Doze espécies de SCN (*S. chromogenes, S. saprophyticus, S. haemolyticus, S.simulans, S. xylosus, S. capitis, S. epidermidis, S. sciuri, S. cohnii, S. hyicus* e *S. aureus* coagulase negativa) foram identificadas pela metodologia de PCR-RFLP nos quartos mamários avaliados neste estudo. Segundo Capurro et al. (2009), dezesseis espécies de SCN já foram isoladas da mastite. O isolamento de diferentes espécies de amostras de leite demonstra a heterogeneidade de espécies de SCN com potencial em causar infecção subclínica na glândula mamária. De forma inesperada, *S. chromogenes* representou 74,07% das amostras identificadas como SCN. Diversos estudos identificaram o *S. chromogenes* como a espécie de SCN mais isolada de IIM (TAPONEN et al., 2007; SUPRÉ et al., 2011; QUIRK et al., 2012), porém, com menor frequência de isolamento que a observada neste estudo. Segundo Pate et al. (2012), baseados em estudos sobre SCN, a prevalência de *S. chromogenes* em amostras de leite variou de 10-61%.

Staphylococcus chromogenes parece ser a espécie de SCN mais adaptada ao úbere bovino, visto que, não é isolada com frequência de locais extramamários (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004; THORBERG et al., 2009). Piessens et al. (2012) relataram alta similaridade entre os genótipos de *S. chromogenes*, e sugeriram que genótipos específicos desta espécie são bem adaptados a glândula mamária, o que é típico de um patógeno verdadeiro do úbere. Consequentemente, a transmissão entre vacas parece ser importante para esta espécie de SCN. Outro fato que pode justificar a alta prevalência desta espécie pode estar relacionado à resistência a antibióticos (PATE et al., 2012) e à capacidade de persistência na glândula mamária. Taponen et al. (2007) relataram que 54,5% das infecções causadas por *S. chromogenes* persistiram durante toda a lactação das vacas avaliadas no estudo. Além disso, o *S. chromogenes* foi identificado como a espécie de SCN com menor sensibilidade aos desinfetantes de tetos usados no manejo de ordenha (QUIRK et al., 2012), o que também pode estar relacionado à alta frequência de isolamento neste estudo.

Outras espécies isoladas com frequência de amostras de leite em outros estudos como *S. epidermidis, S. haemolyticus, S. hyicus, S. simulans,* e *S. xylosus* foram isoladas com menor frequência neste estudo. Ao avaliar as características epidemiológicas de IIM causadas por SCN, estudos relataram que exceto o *S. chromogenes*, as espécies de SCN frequentemente isoladas da pele, esfíncter e canal do teto, não foram as mesmas isoladas de amostras de leite (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009; PIESSENS et al., 2012). O fato de a glândula mamária não ser o reservatório principal para as demais espécies, exceto para o *S. chromogenes*, pode

justificar sua menor frequência de isolamento neste estudo, já que apenas amostras de leite foram coletadas, após completa e adequada desinfecção dos tetos.

Produção, composição e CCS

Ao avaliar o efeito da mastite causada por SCN por meio do primeiro conjunto de dados, todas as variáveis de produção e composição sofreram alteração, exceto a produção de gordura (g/ordenha/quarto). Os quartos mamários com isolamento de SCN produziram 311,25 g/ordenha a mais que os quartos mamários sem isolamento microbiológico. Schukken, Y. H. et al. (2009) avaliaram o efeito da mastite causada por SCN sobre a produção de leite por meio de um modelo misto linear e observaram que vacas com IIM causadas por SCN produziram em média 450 g/dia a mais que as vacas com cultura negativa. Outros estudos também descreveram maior produção de leite em vacas infectadas com SCN que em vacas sadias (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997; PIEPERS et al., 2010) e sugeriram que IIM causadas por SCN podem ter um efeito protetor na glândula mamária contra os patógenos primários da mastite. Porém, perdas na produção de leite podem ser subestimadas quando vacas infectadas são comparadas com grupos de vacas sadias e não com sua produção antecedente à infecção (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Desta forma, é plausível que vacas de alta produção estejam em maior risco de adquirir uma IIM causada por SCN que vacas de produção mais baixa.

A produção de sólidos no leite é positivamente correlacionada com a produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2006). Este fato pode explicar os resultados do presente estudo, no qual maior produção dos componentes do leite (g/ordenha) foi observada nos quartos mamários com isolamento de SCN em comparação com os quartos mamários sadios. No entanto, quando o efeito de IIM causada por SCN foi avaliado sobre a concentração (g/Kg) dos componentes do leite, os quartos mamários com cultura positiva apresentaram resultados significativamente menores que os quartos sadios. Este fato sugere que o efeito da IIM pode ser interpretado erroneamente quando avaliada somente com base na produção total, sem considerar a concentração dos componentes do leite.

Com base na avaliação por meio do primeiro conjunto de dados, a mastite causada por SCN causou aumento da produção e da CCS do leite e redução da concentração dos componentes do leite. No entanto, a avaliação por meio da comparação de quartos mamários infectados por quartos mamários sadios, independentemente de serem contralaterais, pode sofrer influência de fatores de variação entre vacas e entre rebanhos, como potencial genético,

desafio ambiental, sistemas de criação, alimentação e manejo. Os resultados deste estudo sugerem que a avaliação do efeito da IIM causada por SCN por meio da comparação entre quartos contralaterais podem minimizar tais fatores de confundimento.

Com base na análise do segundo conjunto de dados (quartos contralaterais), não houve efeito da mastite causada por SCN sobre a produção e composição do leite, porém observou-se aumento significativo da CCS. Resultados conflitantes foram observados entre a associação de IIM causadas por SCN e a produção de leite, e parte disto pode ser atribuída à variedade de espécies com potencial em causar IIM entre rebanhos leiteiros (THORBERG et al., 2009). Alguns estudos relataram inexistência de correlação entre a IIM causada por SCN com a produção de leite (PARADIS et al., 2010). Pearson et al. (2013) ao avaliar o efeito da IIM causada por SCN por meio da comparação entre vacas gêmeas não observaram efeito da infecção sobre a produção de leite. Poucos estudos relataram correlação negativa da mastite causada por SCN sobre a produção de leite (TIMMS; SCHULTZ, 1987; GROHN et al., 2004).

Algumas espécies de SCN podem causar perdas de produção mais acentuadas que outras. No estudo de Thorberg et al. (2009), vacas com IIM não-persistente causada por *S. simulans* apresentaram menor produção de leite que vacas saudáveis ou vacas com IIM persistente por *S. chromogenes, S. epidermidis,* ou *S. simulans.* No mesmo estudo, vacas com IIM não-persistentes causadas por *S. epidermidis* apresentaram menor produção de leite que vacas com IIM persistentes causadas por *S. chromogenes* e *S. simulans*. Devido à baixa frequência de isolamento da maioria das espécies de SCN no presente estudo, não foi possível a avaliação do efeito da IIM causada por SCN sobre a produção de leite em nível de espécie.

Apesar de não ter sido observado efeito da mastite causada por SCN sobre a produção e composição do leite, a CCS dos quartos infectados foi aproximadamente 8 vezes mais alta que a observada para os quartos mamários sadios (545,80 x 10^3 células/mL *versus* 70,16 x 10^3 células/mL, respectivamente) no presente estudo. *Staphylococcus* coagulase negativa apresentam capacidade de adesão nas células do tecido mamário semelhante ao *S. aureus*, o que pode levar ao aumento de CCS do leite. No entanto, este grupo de agentes apresenta menor grau de invasividade nas células, e consequentemente, menor potencial de lesão no tecido glandular mamário (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). A patogenicidade semelhante ao *S. aureus,* porém com menor potencial de lesão às células mamárias, pode ter causado o aumento na CCS sem causar redução na produção de leite no presente estudo.

A CCS observada para os quartos com IIM causada por SCN neste estudo foi superior à relatada na meta-análise de Djabri et al (2002), na qual a média geométrica de CCS de

quartos infectados por SCN foi 138 x 10^3 células/mL. Estudos relataram que o SCN quando avaliado como um grupo de agentes causadores de mastite apresenta CCS moderadas e com valores intermediários entre quartos mamários sadios e quartos com IIM causada por *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011). De forma contraditória, alguns estudos relataram que a mastite causada por SCN pode causar aumentos na CCS a níveis superiores a 600 x 10^3 células/mL (TAPONEN et al., 2007). Entretanto, o efeito da IIM causada por SCN sobre a CCS é espécie-específico, fato que pode justificar a variação dos resultados entre os estudos. Supré et al. (2011) relataram que quartos mamários infectados por *S. chromogenes, S. simulans* e *S. xylosus* apresentaram aumentos na CCS semelhantes à observada pelo *S. aureus*. No estudo de Thorberg et al. (2009) a CCS não diferiu entre as vacas com IIM subclínicas causadas por *S. chromogenes, S. epidermidis* ou *S. simulans*, apesar destas espécies terem apresentado CCS superiores ao grupo de vacas sadias. Devido à baixa frequência de isolamento de outras espécies além de *S. chromogenes*, uma limitação do presente estudo foi a impossibilidade de realização de avaliação do efeito da mastite causada pelas diferentes espécies de SCN.

Diferenças no efeito da mastite causada por SCN sobre a CCS pode ser explicada pela variação de espécies que ocorre entre os rebanhos (ZADOKS; WATTS, 2009). Neste estudo, a espécie que apresentou a maior CCS foi *S. saprophyticus* (2.085 x 10^3 células/mL). No entanto, este resultado deve ser interpretado com cautela em razão do baixo número de quartos isolados com este patógeno. Com base nos resultados de um estudo epidemiológico realizado na Holanda, a CCS de um isolamento de *S. saprophyticus* foi de apenas 42 x 10^3 células/mL, resultado aproximadamente 20 vezes mais baixo que a média de CCS observada para esta espécie no presente estudo. Um dos cinco isolados de *S. saprophyticus* apresentou contagem de 8.736 x 10^3 células/mL e foi responsável pela alta CCS observada para esta espécie neste estudo. É possível que a alta CCS observada para esse quarto mamário isoladamente esteja relacionada a outros fatores, como por exemplo, uma IIM intercorrente por outros agentes bacterianos sem crescimento na cultura microbiológica. Ao ignorar este quarto mamário, a CCS média dos outros quatro isolados de *S. saprophyticus* foi de 422,25 x 10^3 células/mL, resultado compreendido entre a variação de 200 x 10^3 e 600 x 10^3 células/mL, normalmente relatada para CCS de vacas com mastite causada por SCN (THORBERG et al., 2009). Para uma avaliação precisa do efeito das diversas espécies de SCN sobre a CCS, seria necessário um estudo que envolvesse um grande número de amostras.

Devido à alta prevalência observada, o *S. chromogenes* foi a única espécie em que foi possível realizar uma avaliação do efeito da IIM sobre a produção e composição do leite. Apesar de estudos terem demonstrado que IIM causadas por *S. chromogenes* podem ser

responsáveis por aumento na CCS comparáveis ao *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011), a IIM causada por esta espécie não causou efeito sobre a produção e composição do leite neste estudo. A CCS dos quartos com isolamento de *S. chromogenes* (452,62 x 10^3 células/mL) foi superior a observada no estudo Sampimon et al. (2009), no qual a CCS das vacas infectadas por *S. chromogenes* foi de 192,00 x 10^3 células/mL. Pesquisadores demonstraram que dentre as espécies de SCN, o *S. chromogenes* apresenta capacidade adesiva similar à observada em infecções causadas por *S. aureus*, porém com menor potencial invasivo nas células mamárias. Liberação de protease citotóxica que induz a infiltração de neutrófilos foi relatada em infecções causadas por *S. chromogenes* (ZHANG; MADDOX, 2000). Isto demonstra que esta espécie possui fatores de virulência que estimulam a imunidade local, os quais são caracterizados pela elevação da CCS do leite.

A avaliação do efeito da mastite causada por SCN por meio da comparação de quartos contralaterais proporcionou melhor controle de fatores de variabilidade entre vacas e entre rebanhos. Mesmo sem causar alteração na produção e composição do leite, quartos mamários com isolamento de SCN apresentaram CCS significativamente mais elevadas que os quartos sadios. A mastite causada por SCN contribui significativamente com a CCS do leite de tanque (SCHUKKEN, Y. H. et al., 2009). Desta forma, produtores de leite com alta prevalência de IIM causadas por SCN podem ser prejudicados em programas de bonificação pela qualidade do leite. Entretanto, devido à alta prevalência dos SCN em rebanhos leiteiros, potencial em causar persistência e resistência a antibióticos e aumentos significativos na CCS, é justificável que atenção seja direcionada com o objetivo de reduzir a prevalência destes patógenos em rebanhos leiteiros.

4.5 CONCLUSÃO

A infecção intramamária subclínica causada por SCN não apresenta efeito sobre a produção e composição de leite. No entanto, a IIM causada por SCN, em especial pelo *S. chromogenes* aumenta a CCS. A metodologia de ordenha individual por quartos mamários e o uso de quartos contralaterais evita que os resultados sejam influenciados por fatores variáveis inerentes as vacas e rebanhos e avalia de forma precisa o efeito de IIM bovina causada por SCN sobre a CCS, produção e composição do leite.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A mastite subclínica causada por SCN aumenta a CCS, porém não altera a produção e composição do leite. A técnica de MALDI-TOF MS é um método sensível (95,37%) e que pode ser utilizado na identificação de espécies de SCN causadoras de mastite. *Staphylococcus chromogenes* causa aumento da CCS é a espécie com maior frequência de isolamento em vacas com mastite subclínica causada por SCN. No entanto, a IIM subclínica causada por *S. chromogenes* não causa efeito sobre a produção e composição do leite de vacas.

REFERÊNCIAS

AARETRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 307-312, 1997.

ALATOOM, A. A.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of Direct Colony Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2868-2873, 2011.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis,** v. 31, n. 5, p. 205-212, 2001.

ANAYA-LOPEZ, J. L.; CONTRERAS-GUZMAN, O. E.; CARABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; LOPEZ-MEZA, J. E.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 358-361, 2006.

ANDERSEN, S.; DOHOO, I. R.; OLDE RIEKERINK, R.; STRYHN, H. Diagnosing intramammary infections: Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. **Journal of Dairy Science** v. 93, n. 7, p. 2966-2975, 2010.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 219-225, 1975.

BAIRD-PARKER, A.C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. **Journal of General Microbiology**, 30(3), 409-427, 1963.

BANNERMAN, T. L.; KLEEMAN, K. T.; KLOOS, W. E. Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology, v.** 31, p. 1322-1325, 1993.

BANNERMAN, T. L.; KLEEMAN, K. T.; KLOOS, W. E. Evaluation of the vitek systems gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1322-1325, 1993.

BARKEMA, H. W.; DELUYKER, H. A.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 1999.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine Staphylococcus aureus Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BARKEMA, H. W.; OLDE RIEKERINK, R. G. M. The Canadian udder health situation: results of a large national study.In: . NMC REGIONAL MEETING, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. **Proceedings…** 2006. p. 1-7.

BARREIRO, J. R. ***Fingerprinting*** **por espectrometria de massas para diagnóstico de patógenos em mastite.** 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; SANVIDO, G. B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖTTCHER, V.; EBERLIN, M. N.; DOS SANTOS, M. V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.

BARROS, E. M.; IORIO, N. L. P.; BASTOS, M. D. D.; DOS SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polyrnorphism analysis of a partial groEL gene sequence. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 59, n. 3, p. 251-257, 2007.

BEDIDI-MADANI, N.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, n. 2–3, p. 139-145, 1998.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. **PLoS One**, v. 6, n. 1, 2011.

BENITES, N. R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A.; DA COSTA, E. O. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of espontaneous occurrence. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 8, p. 366-370, 2002.

BENNETT, J. V.; BRACHMAN, P. S. Hospital infection. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.

BES, M.; GUERIN-FAUBLEE, V.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 3-4, p. 287-294, 2000.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1614-1619, 2010.

BLEUL, U.; SACHER, K.; CORTI, S.; BRAUN, U. Clinical findings in 56 cows with toxic mastitis. **Veterinary Record**, v. 159, n. 20, p. 677-680, 2006.

BLOWEY, R.W., EDMONDSON, P. Mastitis control in dairy herds. 2. ed. Falta local: **CAB International,** 2010. p. 266.

BODDIE, R. L.; NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; WATTS, J. L. Udder microflora in nonlactating heifers. **Agri-Practice**, v. 8, n. 2, p. 22-25, 1987.

BORM, A. A.; FOX, L. K.; LESLIE, K. E.; HOGAN, J. S.; ANDREW, S. M.; MOYES, K. M.; OLIVER, S. P.; SCHUKKEN, Y. H.; HANCOCK, D. D.; GASKINS, C. T.; OWENS, W. E.; NORMAN, C. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health,

milk production, and reproductive performance in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2090-2098, 2006.

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

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, título das revista padronizar todas por extenso ou abreviadas v. 51, p. 129-135, 1999.

BRITTEN, A. M. The Role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 187-202, 2012.

CAPURRO, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K. P.; BENGTSSON, B.; ERICSSON-UNNERSTAD, H.; ASPÁN, A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 327-333, 2009.

CAPURRO, A.; ASPAN, A.; UNNERSTAD, H. E.; WALLER, K. P.; ARTURSSON, K. Identification of potential sources of Staphylococcus aureus in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, 2010.

CARRETTO, E.; BARBARINI, D.; COUTO, I.; DE VITIS, D.; MARONE, P.; VERHOEF, J.; DE LENCASTRE, H.; BRISSE, S. Identification of coagulase-negative staphylococci other than Staphylococcus epidermidis by automated ribotyping. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 3, p. 177-184, 2005.

CHANG, Y. M.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, v. 88, n. 3, p. 251-261, 2004.

COMPTON, C. W. R.; HEUER, C.; PARKER, K.; MCDOUGALL, S. Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4157-4170, 2007.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; DE LENCASTRE, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3099-3103, 2001.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, 2001.

DA SILVA, E. R.; BOECHAT, J. U. D.; MARTINS, J. C. D.; FERREIRA, W. P. B.; SIQUEIRA, A. P.; DA SILVA, N. Hemolysin production by Staphylococcus aureus species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1-3, p. 271-275, 2005.

DE VLIEGHER, S.; LAEVENS, H.; DEVRIESE, L. A.; OPSOMER, G.; LEROY, J. L. M.; BARKEMA, H. W.; DE KRUIF, A. Prepartum teat apex colonization with Staphylococcus

chromogenes in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 245-252, 2003.

DE VLIEGHER, S.; OPSOMER, G.; VANROLLEGHEM, A.; DEVRIESE, L. A.; SAMPIMON, O. C.; SOL, J.; BARKEMA, H. W.; HAESEBROUCK, F.; DE KRUIF, A. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by Staphylococcus chromogenes originating from teat apices of dairy heifers. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 215-221, 2004.

DELUYKER, H. A.; VAN OYE, S. N.; BOUCHER, J. F. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 604-614, 2005.

DEVRIESE, L. A.; DEKEYSER, H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy-cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 1, p. 155-158, 1980.

DEVRIESE, L. A.; HAJEK, V.; OEDING, P.; MEYER, S. A.; SCHLEIFER, K. H. Staphylococcus-hyicus (Sompolinsky 1953) comb nov and staphylococcus-hyicus subsp chromogenes subsp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n. 4, p. 482-490, 1978.

DEVRIESE, L. A.; LAEVENS, H.; HAESEBROUCK, F.; HOMMEZ, J. A SIMPLE Identification scheme for coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 2, p. 240-244, 1994.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Staphylococcus pseudintermedius sp nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L. A.; YDE, M.; GODARD, C.; ISIGIDI, B. K. Use of biotyping to trace the origin of staphylococcus-aureus in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 365-369, 1985.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L.; DUFFIELD, T. E.; KEEFE, G. P.; KELTON, D. E.; LISSEMORE, K. D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1-2, p. 75-89, 2004.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGERS, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 335-357, 2002.

DOHOO, I. R.; SMITH, J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 250-261, 2011.

DOHOO, I.; ANDERSEN, S.; DINGWELL, R.; HAND, K.; KELTON, D.; LESLIE, K.; SCHUKKEN, Y.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5515-5522, 2011.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a Variety of Staphylococcus Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 941-945, 2010.

DUFOUR, S.; DOHOO, I. R.; BARKEMA, H. W.; DESCÔTEAUX, L.; DEVRIES, T. J.; REYHER, K. K.; ROY, J. P.; SCHOLL, D. T. Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3110-3124, 2012.

DUPONT, C.; SIVADON-TARDY, V.; BILLE, E.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; ALVAREZ, A. S.; DEGAND, N.; FERRONI, A.; ROTTMAN, M.; HERRMANN, J. L.; NASSIF, X.; RONCO, E.; CARBONNELLE, E. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 998-1004, 2010.

EKMAN, T., ØSTERÅS, O. Mastitis control and dry cow therapy in the Nordic countries. In Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the National Mastitis Council, pp 18-30. 2004.
FOX, L. K.; BESSER, T. E.; JACKSON, S. M. Evaluation of a coagulase-negative variant of Staphylococcus aureus as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 6, p. 1143-&, 1996.

FOX, L. K.; CHESTER, S. T.; HALLBERG, J. W.; NICKERSON, S. C.; PANKEY, J. W.; WEAVER, L. D. Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 7, p. 1619-1628, 1995.

FRENEY, J., KLOOS,W.E.,HAJEK, V.,WEBSTER, J.A., BES, M., BRUN, Y., VERNOZY-ROZAND, C. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, pt. 2, p. 489‑502, 1999.

GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 65-72, 2009.

GOH, S. H.; POTTER, S.; WOOD, J. O.; HEMMINGSEN, S. M.; REYNOLDS, R. P.; CHOW, A. W. WSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: Studies with coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 818-823, 1996.

GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; MEDLEY, G. F.; BROWNE, W. J. Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3764-3776, 2007.

GROHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3358-3374, 2004.

HAJEK, V. Staphylococcus-intermedius, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 4, p. 401-408, 1976.

HAJEK, V.; DEVRIESE, L. A.; MORDARSKI, M.; GOODFELLOW, M.; PULVERER, G.; VARALDO, P. E. Elevation of staphylococcus-hyicus subsp chromogenes (Devriese et-al, 1978) to species status - staphylococcus-chromogenes (Devriese et al, 1978) comb-nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 169-173, 1986.

HALTIA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SPIRIDONOVA, I.; OLKONEN, A.; MYLLYS, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, 2006.

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

HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, A. C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass Spectrometry:** principles and applications. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 2007. 502 p.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S.; HUESTON, W. D.; PRITCHARD, D. E.; BOWMAN, G. L.; HEIDER, L. E.; BROCKETT, B. L.; Conrad, h. r. bacterial counts in bedding materials used on 9 commercial dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 250-258, 1989.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Efficacy of a barrier teat dip containing .55% chlorhexidine for prevention of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2502-2506, 1995.

HOGAN, J. S.; WHITE, D. G.; PANKEY, J. W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than staphylococcus-aureus. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 4, p. 873-879, 1987.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. p. 532-558.

ILINA, E. N.; BOROVSKAYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M.; VERESHCHAGIN, V. A.; KUBANOVA, A. A.; KRUGLOV, A. N.; SVISTUNOVA, T. S.; GAZARIAN, A. O.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; GOVORUN, V. M. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic neisseria. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 75-86, 2009.

JAGLIC, Z.; MICHU, E.; HOLASOVA, M.; VLKOVA, H.; BABAK, V.; KOLAR, M.; BARDON, J.; SCHLEGELOVA, J. Epidemiology and characterization of Staphylococcus epidermidis isolates from humans, raw bovine milk and a dairy plant. **Epidemiology Infection**, v. 138, n. 5, p. 772-782, 2010.

JARP, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 151-158, 1991.

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

KEEFE, G. Update on Control of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae for Management of Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012.

KIRK, J. H.; WRIGHT, J. C.; BERRY, S. L.; REYNOLDS, J. P.; MAAS, J. P.; AHMADI, A. Relationships of milk culture status at calving with somatic cell counts and milk production of dairy heifers during early lactation on a Californian dairy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 28, n. 3, p. 187-198, 1996.

KLOOS, W. E.; LAMBE, D. W. J. R. *Staphylococcus.* In: BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, DC.: ASM. Press, 1991. p. 222-237.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical-significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.

KRISTULA, M. A.; ROGERS, W.; HOGAN, J. S.; SABO, M. Comparison of bacteria populations in clean and recycled sand used for bedding in dairy facilities. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4317-4325, 2005.

KUROISHI, T.; KOMINE, K.; KAI, K.; ITAGAKI, M.; KOBAYASHI, J.; OHTA, M.; KAMATA, S.; KUMAGAI, K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 8, p. 899-906, 2003.

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. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3219-3226, 1997.

LAM, T.; SCHUKKEN, Y. H.; VANVLIET, J. H.; GROMMERS, F. J.; TIELEN, M. J. M.; BRAND, A. Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 1, p. 17-22, 1997.

LEITNER, G.; LUBASHEVSKY, E.; GLICKMAN, A.; WINKLER, M.; SARAN, A.; TRAININ, Z. Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows: I. Challenge trials. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, n. 1–2, p. 31-38, 2003.

LIM, G. H.; LESLIE, K. E.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; TIMMS, L. L.; DINGWELL, R. T. Adherence and efficacy of an external teat sealant to prevent new

intramammary infections in the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1289-1300, 2007.

LINDE, C.; HOLMBERG, O.; ASTROM, G. The interference between coagulase negative staphylococci and corynebacterium-bovis and the common udder pathogens in the lactating cow. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 32, n. 12, p. 552-558, 1980.

LOONEN, A. J. M.; JANSZ, A. R.; BERGLAND, J. N. B.; VALKENBURG, M.; WOLFFS, P. F. G.; VAN DEN BRULE, A. J. C. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1437-1439, 2012.

LOPEZ-BENAVIDES, M. G.; WILLIAMSON, J. H.; PULLINGER, G. D.; LACY-HULBERT, S. J.; CURSONS, R. T.; LEIGH, J. A. Field observations on the variation of Streptococcus uberis populations in a pasture-based dairy farm. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5558-5566, 2007.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3466-3472, 2003.

MARINACH-PATRICE, C.; FEKKAR, A.; ATANASOVA, R.; GOMES, J.; DJAMDJIAN, L.; BROSSAS, J. Y.; MEYER, I.; BUFFET, P.; SNOUNOU, G.; DATRY, A.; HENNEQUIN, C.; GOLMARD, J. L.; MAZIER, D. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. **PLoS One**, v. 5, n. 1, 2010.

MATOS, J. S.; WHITE, D. G.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Isolation of Staphylococcus aureus from Sites Other than the Lactating Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1544-1549, 1991.

MATSUDA, N.; MATSUDA, M.; NOTAKE, S.; YOKOKAWA, H.; KAWAMURA, Y.; HIRAMATSU, K.; KIKUCHI, K. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3862-3866, 2012.

MATTHEWS, K. R.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Prevalence of Staphylococcus species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows1. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 7, p. 1835-1839, 1992.

MATTHEWS, K. R.; HARMON, R. J.; SMITH, B. A. Protective effect of staphylococcus-chromogenes infection against staphylococcus-aureus infection in the lactating bovine mammary-gland. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3457-3462, 1990.

MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P.; KING, S. H. Comparison of vitek gram-positive identification system with api staph-trac system for species identification of staphylococci of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1649-1651, 1990.

MCDOUGALL, S. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 6, p. 226-232, 1998.

MCDOUGALL, S.; ARTHUR, D. G.; BRYAN, M. A.; VERMUNT, J. J.; WEIR, A. M. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n. 4, p. 161-170, 2007.

MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKAYA, A. D.; DRAKE, R. R.; EIGNER, U.; FAHR, A. M.; HE, Y.; ILINA, E. N.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; MANCINELLI, L.; MOUSSAOUI, W.; PREVOST, G.; PUTIGNANI, L.; SEACHORD, C. L.; TANG, Y. W.; HARMSEN, D. High Interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3732-3734, 2009.

MILLER, G. Y.; BARTLETT, P. C.; LANCE, S. E.; ANDERSON, J.; HEIDER, L. E. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 8, p. 1230-1236, 1993.

MILNE, M.; NOLAN, A.; CRIPPS, P.; FRITON, G.; FITZPATRICK, J. Assessment of pain in dairy cows with clinical mastitis. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 23., 2004, Quebec, Canada. **Proceedings…** 2004. p. 167

MUNOZ, M. A.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Molecular epidemiology of two Klebsiella pneumoniae mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3964-3971, 2007.

MYLLYS, V. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 1, p. 51-60, 1995.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: WI, NMC Inc., 1999. p. 1-64.

NEWTON, H. T.; GREEN, M. J.; BENCHAOUI, H.; CRACKNELL, V.; ROWAN, T.; BRADLEY, A. J. Comparison of the efficacy of cloxacillin alone and cloxacillin combined with an internal teat sealant for dry-cow therapy. **Veterinary Record**, v. 162, n. 21, p. 678-684, 2008.

OLIVEIRA, L.; RODRIGUES, A. C.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of Staphylococcus aureus recovered from milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 10, p. 1361-1368, 2011.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. E.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Biofilm-forming ability profiling of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 133-140, 2006.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; IVEY, S. J.; LEWIS, M. J.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; MOOREHEAD, H.; DOWLEN, H. H.; CHESTER, S. T.; HALLBERG, J. W. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Verona, WI: National Mastitis Council**,** 2004.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M. Coagulase-negative staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during the nonlactating and periparturient periods. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 44, n. 6, p. 355-363, 1997.

OLIVER, S. P.; MITCHELL, B. A. Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 5, p. 1180-1183, 1983.

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

OSTERAS, O.; SOLVEROD, L.; REKSEN, O. Milk culture results in a large Norwegian survey - Effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 1010-1023, 2006.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 313-317, 1997.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A.; WILDMAN, E. E. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1550-1552, 1991.

PARADIS, M. È.; BOUCHARD, É.; SCHOLL, D. T.; MIGLIOR, F.; ROY, J. P. Effect of nonclinical Staphylococcus aureus or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2989-2997, 2010.

PARK, J. Y.; FOX, L. K.; SEO, K. S.; MCGUIRE, M. A.; PARK, Y. H.; RURANGIRWA, F. R.; SISCHO, W. M.; BOHACH, G. A. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 1–2, p. 149-154, 2011.

PARKER, K. I.; COMPTON, C.; ANNISS, F. M.; WEIR, A.; HEUER, C.; MCDOUGALL, S. Subclinical and clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 207-218, 2007.

PATE, M.; ZDOVC, I.; AVBERŠEK, J.; OCEPEK, M.; PENGOV, A.; PODPEČAN, O. Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of Staphylococcus chromogenes and Staphylococcus haemolyticus by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 2, p. 129-134, 2012.

PEARSON, L. J.; WILLIAMSON, J. H.; TURNER, S. A.; LACY-HULBERT, S. J.; HILLERTON, J. E. Peripartum infection with Streptococcus uberis but not coagulase-negative staphylococci reduced milk production in primiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 158-164, 2013.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P.H.F.; COSTA Jr., L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos. Juiz de Fora: Epamig, 2001. 234 p.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, L.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; DE VLIEGHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically

infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 478-483, 2007.

PIEPERS, S.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; DE KRUIF, A.; DE VLIEGHER, S. Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 2014-2024, 2010.

PIEPERS, S.; PEETERS, K.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; FRANKENA, K.; DE VLIEGHER, S. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 99, n. 2-4, p. 91-101, 2011.

PIESSENS, V.; DE VLIEGHER, S.; VERBIST, B.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRICKX, M.; VAN COILLIE, E. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative Staphylococcus species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 62-71, 2012.

PIESSENS, V.; SUPRE, K.; HEYNDRICKX, M.; HAESEBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S.; VAN COILLIE, E. Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 3, p. 287-294, 2010.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRÉ, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRICKX, M.; DE VLIEGHER, S. Distribution of coagulase-negative Staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2933-2944, 2011.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262-273, 2007.

PYORALA, S. H. K.; PYORALA, E. O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 3, p. 407-+, 1998.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 3-8, 2009.

QUIRK, T.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; CAPPER, J.; WENZ, J.; PARK, J. Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative staphylococci after postmilking teat disinfection: Species-specific responses. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1906-1912, 2012.

RAINARD, P.; DUCELLIEZ, M.; POUTREL, B. The contribution of mammary infections by coagulase-negative staphylococci to the herd bulk milk somatic-cell count. **Veterinary Research Communications**, v. 14, n. 3, p. 193-198, 1990.

RAINARD, P.; POUTREL, B. Effect of naturally-occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 3, p. 327-329, 1988.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1–2, p. 33-42, 2004.

REYHER, K. K.; HAINE, D.; DOHOO, I. R.; REVIE, C. W. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens-A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6483-6502, 2012.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Ecology of staphylococcus-aureus isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 11, p. 3354-3364, 1994.

ROESCH, M.; DOHERR, M. G.; SCHAREN, W.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J. W. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 86-92, 2007.

ROSSI, F.; TOFALO, R.; TORRIANI, S.; SUZZI, G. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of Staphylococcus xylosus strains from dry sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 365-371, 2001.

RUEGG, P. L. New Perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 2012.

RUEGG, P. L. The quest for the perfect test: Phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 15-19, 2009.

RUELLE, V.; EL MOUALIJ, B.; ZORZI, W.; LEDENT, P.; DE PAUW, E. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 18, p. 2013-2019, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPIMON, O. C.; BARKEMA, H. W.; BERENDS, I. M. G. A.; SOL, J.; LAM, T. J. G. M. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 37-44, 2009.

SAMPIMON, O. C.; LAM, T.; MEVIUS, D. J.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 1-2, p. 173-179, 2011.

SAMPIMON, O.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; SANTMAN-BERENDS, I.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v. 77, n. 3, p. 318-324, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1. ed. Barueri: Manole. 2007. 314p.

SANTOS, O. C. D.; BARROS, E. M.; BRITO, M.; BASTOS, M. D. D.; DOS SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1-2, p. 134-140, 2008.

SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 73-81, 2009.

SCHÄLLIBAUM, M. Mastitis-pathogens isolated in Switzerland: 1987-1996. IDF Mastitis Newsletter 24:38. 2001.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPERBALZ, R.; DEVRIESE, L. A. Staphylococcus-arlettae sp-nov, staphylococcus-equorum sp-nov and staphylococcus-kloosii sp-nov - 3 new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 501-509, 1984.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 9-14, 2009.

SCHUKKEN, Y. H.; VANDEGEER, D.; GROMMERS, F. J.; SMIT, J. A. H.; BRAND, A. Intramammary infections and risk-factors for clinical mastitis in herds with low somatic-cell counts in bulk milk. **Veterinary Record**, v. 125, n. 15, p. 393-396, 1989.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Vet. Res.**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 171-+, 2003.

SHAH, M. M.; IIHARA, H.; NODA, M.; SONG, S. X.; NHUNG, P. H.; OHKUSU, K.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T. dnaJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus Staphylococcus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n., p. 25-30, 2007.

SHARMA, N.; RHO, G. J.; HONG, Y. H.; KANG, T. Y.; LEE, H. K.; HUR, T. Y.; JEONG, D. K. Bovine Mastitis: An Asian Perspective. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 6, p. 454-476, 2012.

SHPIGEL, N. Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 1998.

SILVA, L. F. P.; ETCHEBARNE, B. E.; WEBER NIELSEN, M. S.; LIESMAN, J. S.; KIUPEL, M.; VANDEHAAR, M. J. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3034-3044, 2008.

SIMOJOKI, H. et al. Experimental model of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus chromogenes*. In: HEIFER MASTITIS CONFERENCE**,** 2007, Ghent, Belgium. **Proceedings…** 2007. p. 71-72.

SIMOJOKI, H.; ORRO, T.; TAPONEN, S.; PYORALA, S. Host response in bovine mastitis experimentally induced with Staphylococcus chromogenes. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 95-99, 2009.

SIVADON, V.; ROTTMAN, M.; QUINCAMPOIX, J. C.; AVETTAND, V.; CHAVEROT, S.; DE MAZANCOURT, P.; TRIEU-CUOT, P.; GAILLARD, J. L. Use of sodA sequencing for the identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 10, p. 939-942, 2004.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463-2472, 1992.

SKOW, A.; MANGOLD, K. A.; TAJUDDIN, M.; HUNTINGTON, A.; FRITZ, B.; THOMSON, R. B.; KAUL, K. L. Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2876-2880, 2005.

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

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; MELVILLE, P. A.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **The Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 63-70, 2010.

SOUZA, M. S. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 164 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

SPANU, T.; DE CAROLIS, E.; FIORI, B.; SANGUINETTI, M.; D'INZEO, T.; FADDA, G.; POSTERARO, B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 1, p. 44-49, 2011.

STEPANOVIC, S.; DAKIC, I.; MARTEL, A.; VANEECHOUTTE, M.; MORRISON, D.; SHITTU, A.; JEZEK, P.; DECOSTERE, A.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. A

comparative evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of members of the Staphylococcus sciuri group. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 353-357, 2005.

SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S. Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2329-2340, 2011.

TAPONEN, S. Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. Academic dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Walter Hall, Agnes Sjöbergin katu 2, Helsinki, 2008.

TAPONEN, S. **Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci**. Finland: Department of Production Animal Medicine, University of Helsinki, Helsinki, 2008. 63 p.

TAPONEN, S.; JANTUNEN, A.; PYORALA, E.; PYORALA, S. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, n. 1-2, p. 53-62, 2003.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine Intramammary Infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3301-3307, 2007.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from Staphylococcus aureus? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 29-36, 2009.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H. D.; PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1–3, p. 199-207, 2006.

TENHAGEN, B. A.; KOSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2542-2551, 2006.

THORBERG, B. M.; DANIELSSON-THAM, M. L.; EMANUELSON, U.; PERSSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962-4970, 2009.

THORBERG, B. M.; KUHN, I.; AARESTRUP, F. M.; BRANDSTROM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THARN, M. L. Pheno- and genotyping of Staphylococcus epidermidis isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 163-172, 2006.

TIMMS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 12, p. 2648-2657, 1987.

TODHUNTER, D. A.; CANTWELL, L. L.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H.; HOGAN, J. S. Characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 373-380, 1993.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P.; HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 234-246, 2013.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ADKINSON, R. W. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 639-647, 1990.

WAAGE, S.; MORK, T.; ROROS, A.; AASLAND, D.; HUNSHAMAR, A.; ODEGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

WAAGE, S.; SKEI, H. R.; RISE, J.; ROGDO, T.; SVILAND, S.; ODEGAARD, S. A. Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 70-76, 2000.

WATTS, J. L.; WASHBURN, P. J. Evaluation of the staph-zym system with staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 59-61, 1991.

WHITE, D. G.; HARMON, R. J.; MATOS, J. E. S.; LANGLOIS, B. E. Isolation and identification of coagulase-negative staphylococcus species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1886-1892, 1989.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; CASE, K. L.; GARRISON, L. L.; GROHN, Y. T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1664-1670, 1999.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GROHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Cow- and quarter-level risk factors for Streptococcus uberis and Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2649-2663, 2001.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011.

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

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

ZDANOWICZ, M.; SHELFORD, J. A.; TUCKER, C. B.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1694-1701, 2004.

ZHANG, S. L.; MADDOX, C. W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1102-1108, 2000.