

PERSISTÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVOS EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS DE OVELHAS COM MASTITE SUBCLÍNICA APÓS O TRATAMENTO ANTIMICROBIANO À SECAGEM

PERSISTENCE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN MAMMARY GLANDS OF SHEEP WITH SUBCLINICAL MASTITIS AFTER ANTIMICROBIAL TREATMENT AT DRYING-OFF

Luiz Francisco Zafalon^{1*}
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha²
Danilo Flávio Moraes Riboli²
Lucas Eduardo Pilon³

1 Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

2 Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

3 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil.

*Autor para correspondência - luiz.zafalon@embrapa.br

Resumo

Staphylococcus coagulase-negativos (SCN) são os principais micro-organismos responsáveis pela mastite ovina e o tratamento ao final da lactação pode ser usado como método de controle contra a doença. Porém, o longo período seco apresentado pelas ovelhas em alguns sistemas de criação pode prejudicar os efeitos positivos do tratamento antimicrobiano. Os objetivos deste trabalho foram identificar as principais espécies de SCN na etiologia da mastite ovina antes e após o tratamento ao final da lactação das ovelhas, bem como investigar a persistência das espécies mais prevalentes na glândula mamária na lactação seguinte. Sessenta ovelhas foram divididas em dois grupos experimentais, um deles formado por animais sem tratamento antimicrobiano, enquanto o outro era composto por ovelhas cujas metades mamárias foram tratadas com cloxacilina-benzatina por via intramamária. As amostras de leite foram obtidas antes da secagem e aos 15 e 30 dias após o parto da lactação seguinte. As espécies prevalentes foram *S. warneri*, *S. simulans* e *S. epidermidis*. Clones das três espécies de maior ocorrência foram identificados antes e depois do tratamento, ou seja, mesmo com o extenso período seco entre as duas lactações consecutivas, os micro-organismos ainda foram identificados no interior da glândula mamária.

Palavra-chave: bacteriologia; glândula mamária; leite ovino; métodos de controle da mastite.

Abstract

Coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) are the main microorganisms responsible for mastitis in sheep and the treatment in the end of lactation can be used as a control method against disease. However, the long dry period presented by ewes in some breeding systems may impair the positive effects of antimicrobial treatment. The aims of this study were to identify the main CNS species in the etiology of ovine mastitis before and after treatment at dry-off of the ewes, as well as investigate the persistence of the most prevalent species in the mammary gland at the next lactation. Sixty sheep

were divided into two experimental groups, one consisting of animals without antimicrobial treatment, while the other was composed by sheep whose mammary halves were treated with cloxacillin-benzathine intramammary. The milk samples were obtained before drying-off and at 15 and 30 days after calving the next lactation. The prevalent species were *S. warneri*, *S. simulans* and *S. epidermidis*. Clones of the three species more prevalent were identified before and after treatment, i.e., even with the extensive dry period between the two consecutive lactations, the microorganisms were still identified in the mammary gland.

Keywords: bacteriology; mammary gland; mastitis control methods; milk sheep.

Recebido em: 07 de dezembro de 2016

Aceito em: 13 de setembro de 2017

Introdução

A mastite está entre os principais problemas sanitários na criação de ovinos. Constitui-se em um sério prejuízo econômico aos produtores devido à redução da produtividade e também oferece riscos à saúde pública⁽¹⁾, em função dos micro-organismos de caráter zoonótico envolvidos na etiologia infecciosa da doença. A enfermidade apresenta duas formas de apresentação, a clínica, facilmente diagnosticada por alterações no leite e no úbere⁽²⁾, além da mastite subclínica, em que não há alterações macroscópicas da glândula mamária e o diagnóstico é realizado por meio de exames complementares⁽³⁾, que identificam as alterações inflamatórias no leite. Outra consequência negativa da doença é a redução do ganho de peso diário de cordeiros em raças ovinas destinadas à produção de carne, mas com boa produção de leite⁽⁴⁾, além de afetar a qualidade do produto devido às alterações inflamatórias na glândula mamária.

Devido aos prejuízos econômicos, o uso de métodos de controle contra a mastite é necessário para aqueles rebanhos com histórico da doença. Uma das maneiras utilizadas por técnicos e produtores para controlar a mastite é o tratamento com o uso de antimicrobianos⁽⁵⁾. O período imediatamente anterior à secagem da ovelha é um dos momentos em que essa conduta pode ser utilizada, entretanto o longo período seco das ovelhas que não são destinadas à produção de leite pode comprometer a eficácia dessa forma de controle.

Staphylococcus coagulase-negativos (SCN) são os principais micro-organismos responsáveis pela mastite em ovinos^(6,7). A evidenciação de clones bacterianos predominantes em diferentes períodos da lactação das ovelhas pode permitir a investigação a respeito da transmissão de patógenos de animal para animal ou se estes patógenos persistem na glândula mamária.

Uma vez que há poucos estudos em rebanhos brasileiros a respeito da evolução da infecção intramamária causada por SCN após o tratamento das ovelhas antes do início do período seco, objetivou-se identificar no leite de ovelhas as espécies de SCN de maior ocorrência antes e após o tratamento antimicrobiano e determinar se há persistência das espécies mais prevalentes na glândula mamária após o tratamento.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado em rebanho experimental formado por ovelhas das raças Santa Inês e Morada

Nova, localizado no município de São Carlos, São Paulo, Brasil. Previamente ao início do estudo, os animais foram submetidos à avaliação clínica geral e específica da glândula mamária, conforme a rotina da propriedade. As ovelhas selecionadas para inclusão nos grupos experimentais não apresentavam nenhuma patologia, nem sinais de mastite clínica. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, registrado sob o número PRT 04/2015.

As amostras de leite foram obtidas em duplicatas em três diferentes períodos: a partir de 15 dias antes da desmama; e no 15° e 30° dias pós-parto, ambos na lactação consecutiva. As glândulas mamárias foram consideradas positivas para a mastite subclínica quando apresentavam qualquer escore positivo ao *California Mastitis Test* (CMT) e com contagem de células somáticas (CCS) superior a 250.000 células / mL de leite⁽⁸⁾, em conjunto com o isolamento microbiológico. A interpretação dos resultados dos exames microbiológicos foi conduzida de acordo com Pradieé et al.⁽⁹⁾, com crescimento simultâneo das colônias bacterianas nas duas amostras de leite colhidas de cada metade mamária.

As amostras de leite para a CCS foram acondicionadas em frascos plásticos contendo pastilhas de bronopol, encaminhadas no mesmo dia das colheitas para laboratório de referência da Rede Brasileira de Qualidade do Leite. Os procedimentos de contagem celular foram realizados com o uso da técnica de citometria de fluxo em aparelho eletrônico Somacount 300 (Bentley Instruments[®]), cujas amostras de leite apresentaram os núcleos das células coradas e expostas a um raio laser, com reflexo da luz vermelha (fluorescência) e transformação dos sinais em impulsos elétricos detectados por um fotomultiplicador e transformados em número de células/mL.

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais. Um deles composto por 21 animais com mastite subclínica que não receberam tratamento antimicrobiano, enquanto o grupo com tratamento antimicrobiano era composto por 39 animais com mastite subclínica, tratados com cloxacilina por via intramamária.

A administração dos antimicrobianos foi realizada após esgota manual completa do úbere e antisepsia com álcool isopropílico 70% dos esfíncteres dos tetos, procedimentos realizados três dias após o desmame dos cordeiros. A infusão dos medicamentos intramamários foi feita de acordo com Mavrogiani et al.⁽¹⁰⁾, com o uso de estrutura flexível de um cateter intravenoso esterilizado tamanho n° 20 (1,1 mm calibre x 48 mm comprimento) individual para cada glândula mamária, adentrando aproximadamente meio centímetro no canal do teto. Após a infusão do antimicrobiano, foi realizada massagem nas glândulas mamárias para a distribuição homogênea do medicamento. A avaliação clínica das glândulas mamárias por meio de palpação e inspeção visual foi feita antes, durante, uma e 24 horas após a administração do medicamento. Todas as ovelhas foram submetidas ao mesmo sistema de manejo alimentar (pasto rotacionado mais suplemento na época seca). Os animais foram mantidos em piquetes de capim Tanzânia durante todo o período experimental e, no período seco do ano, suplementados com fornecimento diário de silagem de milho. Sal mineral e água foram fornecidos à vontade.

A investigação das espécies de SCN no leite dos animais foi feita, preliminarmente, por meio da semeadura de alíquotas de 10 µL de leite em ágar-sangue ovino desfibrinado a 5%, incubadas a 37°C por até 72 horas, com leituras a cada 24 horas. A identificação estafilocócica foi realizada de acordo com Bergey & Holt⁽¹¹⁾ e testes foram conduzidos para diferenciação entre *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp.⁽¹²⁾. *Staphylococcus* spp. foram submetidos à prova da coagulase lenta em plasma de coelho, com leituras realizadas uma, duas, três, quatro e 24 horas após a incubação das amostras a 37°C. A identificação genotípica das espécies de SCN foi realizada utilizando-se *primers* de

sequências conservadas adjacentes aos genes 16S (*GI* “GAAGTCGTAACAAGG”) e 23S (*LI* “CAAGGCATCCACCGT”) pela técnica *Internal Transcribed Spacer* PCR (ITS-PCR)⁽¹³⁾. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% preparada em tampão 1,0 X TBE e corado com Saber Safe.

A técnica de PFGE foi realizada para a identificação das linhagens e dos perfis clonais bacterianos em estirpes de *S. warneri*, *S. simulans* e *S. epidermidis* antes e depois do tratamento. Essas espécies foram investigadas por se apresentarem como as prevalentes dentre as identificadas nas amostras de leite. As análises foram realizadas segundo o protocolo modificado de McDougall et al.⁽¹⁴⁾, a fim de identificar as linhagens bacterianas e o perfil clonal dos microrganismos. As amostras foram colocadas em caldo BHI onde cresceram por 24 horas. Após o crescimento, em um microtubo previamente pesado, 0,5 mL da amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 50 segundos.

Depois de desprezado o sobrenadante, o microtubo foi novamente pesado e foram adicionados 300µL de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em mL. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Após a homogeneização, foram adicionados 5µL de lisostafina (1mg/mL em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µL de *agarose low melt*.

As amostras foram vertidas nos moldes para plugs até que solidificassem e, então, colocadas em 2mL de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio), 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas a 37°C por pelo menos 4 horas. A solução foi retirada e os plugs foram lavados com 2mL de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora.

A restrição do DNA genômico foi feita com metade de um plug, utilizando-se a enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*[®], Fermentas Life Science, Canadá) em 50µL de tampão de restrição. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System[®] (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) feito com TBE 0,5X sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21 horas; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5X TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker[®] (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed[®] (10.000X em água, Biotium, EUA) por 45 minutos, e fotografados sob transluminação UV.

A determinação da similaridade das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos foi realizada por meio dos cálculos dos coeficientes de correlação de Dice. Dendogramas foram criados pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetic averages*), por meio do software BioNumerics[®] (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica). Considerou-se clones as estirpes com percentual de similaridade $\geq 80\%$ ⁽¹⁵⁾.

Resultados e Discussão

As estirpes de SCN isoladas nas glândulas mamárias das ovelhas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados em ovelhas antes da secagem e aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação consecutiva

Espécies	Períodos						Total	
	Antes da secagem		15 dias pós-parto		30 dias pós-parto			
	N	%	N	%	N	%		
<i>S. warneri</i>	15	26,3	7	19,4	12	35,3	34	26,8
<i>S. simulans</i>	14	24,5	5	13,9	4	11,8	23	18,1
<i>S. epidermidis</i>	9	15,8	5	13,9	1	2,9	15	11,8
<i>S. xylosus</i>	8	14,0	4	11,1	2	5,9	14	11,0
<i>S. cohnii</i>	1	1,8	2	5,6	4	11,8	7	5,5
<i>S. capitis</i>	1	1,8	2	5,6	3	8,8	6	4,7
<i>S. haemolyticus</i>	2	3,5	2	5,6	1	2,9	5	3,9
<i>S. hominis</i>	1	1,8	2	5,6	2	5,9	5	3,9
<i>S. chromogenes</i>	3	5,2	-	-	2	5,9	5	3,9
<i>S. lentus</i>	1	1,8	1	2,7	1	2,9	3	2,4
<i>S. caprae</i>	1	1,8	1	2,7	1	2,9	3	2,4
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	2	5,6	-	-	2	1,6
<i>S. schleiferi</i>	-	-	2	5,6	-	-	2	1,6
<i>S. sciuri</i>	-	-	1	2,7	1	2,9	2	1,6
<i>S. auriculares</i>	1	1,8	-	-	-	-	1	0,8
Total	57	100,0	36	100,0	34	100,0	127	100,0

Staphylococcus warneri (26,8%), *S. simulans* (18,1%) e *S. epidermidis* (11,8%) foram as espécies mais prevalentes nos três períodos avaliados e, assim, escolhidas para terem os seus perfis clonais estudados, apesar de não ter sido possível a investigação dos grupos clonais em todos os micro-organismos destas espécies.

Estes achados diferem em parte dos relatados por Vanderhaeghen et al.⁽¹⁶⁾, que mencionaram como espécie de maior ocorrência *S. chromogenes*, além de *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, mas não consideraram *S. warneri* entre as espécies mais prevalentes. Em rebanho localizado no estado de Santa Catarina, Dall Agnol et al.⁽¹⁷⁾ relataram a presença de *S. epidermidis* e *S. simulans* na etiologia infecciosa da mastite ovina e não identificaram *S. warneri* dentre as espécies isoladas. Porém, estes autores não conseguiram identificar a espécie estafilocócica em 55,6% dos isolados.

Os dendrogramas que representam as similaridades das estirpes de *S. warneri*, *S. simulans* e *S. epidermidis* estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

Três grupos clonais de *S. warneri* foram identificados nos diferentes períodos acompanhados. Todos eles estavam presentes antes do tratamento e aos 15 e 30 dias da lactação subsequente ao tratamento. A ovelha “18” apresentou *S. warneri* pertencente ao mesmo grupo clonal antes do tratamento, 15 e 30 dias após o parto da lactação seguinte. O mesmo ocorreu com a ovelha “7” antes do tratamento e aos 15 dias pós-parto, porém a espécie pertencia a um grupo clonal distinto ao encontrado na ovelha

“18”.

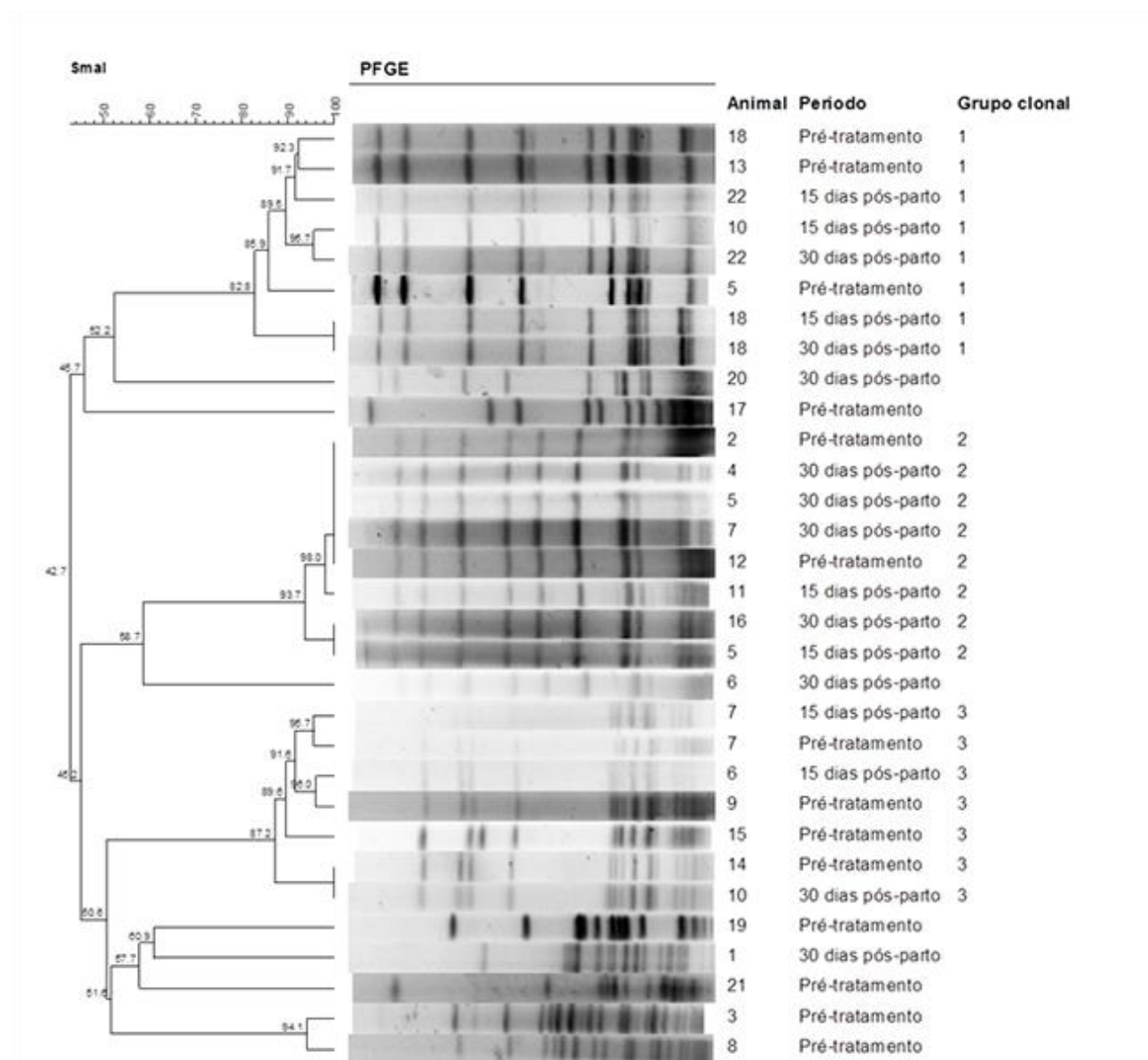


Figura 1. Dendrograma gerado pela análise dos perfis PFGE – SmaI de *Staphylococcus warneri* antes da secagem e após o parto na lactação consecutiva (similaridade $\geq 80\%$).

No primeiro caso (ovelha 18) tratava-se de uma ovelha não submetida à terapia antimicrobiana. Diferentemente, a ovelha “7” recebeu tratamento antimicrobiano, ou seja, a terapia apresentou-se ineficaz para promover a eliminação do micro-organismo da glândula mamária. Os animais passaram por um longo período sem produção de leite, em média 152 dias, e a identificação de um grupo clonal pode estar relacionada com a capacidade do micro-organismo permanecer na glândula mamária por esse período ou por haver reinfecção do animal devido ao convívio com outros onde o mesmo grupo clonal foi identificado. Clones foram observados em dois animais antes do tratamento, nas ovelhas “3” e “8”.

Diferentes intervalos de tempo poderiam ser usados para a avaliação da capacidade de persistência de micro-organismos no interior da glândula mamária. No presente trabalho, 15 e 30 dias após o parto foram escolhidos devido a características de manejo do rebanho e, também, por esse período ter sido

considerado ideal para não haver interferência das altas contagens de células somáticas imediatamente depois das parições para a classificação de um caso de mastite subclínica.

O agrupamento dos animais não foi possível em espaços de tempo inferiores, pois a obtenção das amostras seguiu calendários pré-definidos em que outras atividades de manejo eram feitas no rebanho. Outros autores, como Veh et al.⁽¹⁸⁾, caracterizaram *S. aureus* persistentes e não persistentes durante a lactação e o período seco de vacas e definiram um intervalo de tempo de no mínimo seis semanas para a classificação da persistência de estirpes estafilocócicas na glândula mamária, apesar do presente trabalho estar relacionado com espécie animal distinta.

S. chromogenes não estava entre as espécies de maior ocorrência no rebanho estudado, apesar de também ter sido isolado, mas estudos anteriores relataram a persistência de clones deste micro-organismo isolados antes do parto e depois, na lactação subsequente⁽¹⁹⁾. Segundo estes autores, os achados expressaram a habilidade do micro-organismo para sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, mesmo após o tratamento da mastite na secagem da ovelha. Em bovinos, a formação de biofilmes é uma possível causa pela qual estafilococos causadores de mastite evitam a resposta imune do animal e causam infecção intramamária persistente⁽²⁰⁾, permanecendo na glândula mamária.

Em vacas, amostras de *S. aureus* que persistiram no decorrer do período seco produziram significativamente mais biofilme *in vitro* que amostras que não persistiram após a parição, sendo possível que a terapia à secagem seja menos eficiente contra os micro-organismos com grande formação de biofilmes⁽¹⁸⁾. Estes mesmos autores citaram que *S. aureus* que persistem durante a lactação e no período seco são problemáticos porque permanecem como reservatórios para novas infecções dentro do rebanho.

A distribuição dos três principais grupos clonais de *S. warneri* entre os períodos pré e pós-tratamento pareceu ser uniforme. Entretanto, um dos clones apresentou ocorrência superior nas ovelhas que não foram tratadas contra a mastite (6/8), enquanto outro clone ocorreu predominantemente em animais tratados (10/15). Dentre os três grupos clonais de *S. warneri* presentes no rebanho, um deles pareceu predominar em ovelhas Morada Nova, independentemente se foram ou não tratadas, com similaridades de 93,7% a 100,0%.

A presença de um mesmo grupo clonal em diferentes animais pode ter como explicação a ampla disseminação destes grupos bacterianos na propriedade. Estes micro-organismos poderiam ter causado novos casos de mastite em animais não afetados anteriormente por estes clones ou que estavam com mastite causada por outros micro-organismos. A presença de um reservatório para duas amostras bacterianas semelhantes é possível⁽¹⁹⁾. Piquetes com barro ou sujos com presença de fezes, principalmente nas fases imediatamente anterior e posterior ao parto, podem ter favorecido a existência de diversas fontes de contaminação, comumente em épocas com maior ocorrência de chuvas na propriedade quando a limpeza do ambiente é mais difícil.

Clones de *S. simulans* (Figura 2) também foram revelados na mesma metade mamária e em períodos diferentes em três ovelhas (“11”, “12” e “16”), todas tratadas contra a mastite. Taponen et al.⁽²¹⁾ relataram a persistência de SCN no decorrer da lactação no interior da glândula mamária de ovelhas. No presente estudo, em duas ovelhas (“12” e “16”) clones de *S. simulans* podem ter permanecido na metade mamária de uma mesma ovelha após transcorrido todo o período seco e não somente durante a lactação.

A reinfecção das glândulas mamárias com micro-organismos dispersos no ambiente não pode ser descartada, já que a possível disseminação destes micro-organismos corrobora com a sua manutenção

no rebanho. A presença de clones em diferentes animais em períodos de colheita de amostras distintos pode ser facilitada pela presença de SCN na pele do teto, que podem invadir a glândula mamária, assim como ocorre em vacas leiteiras⁽¹⁹⁾.

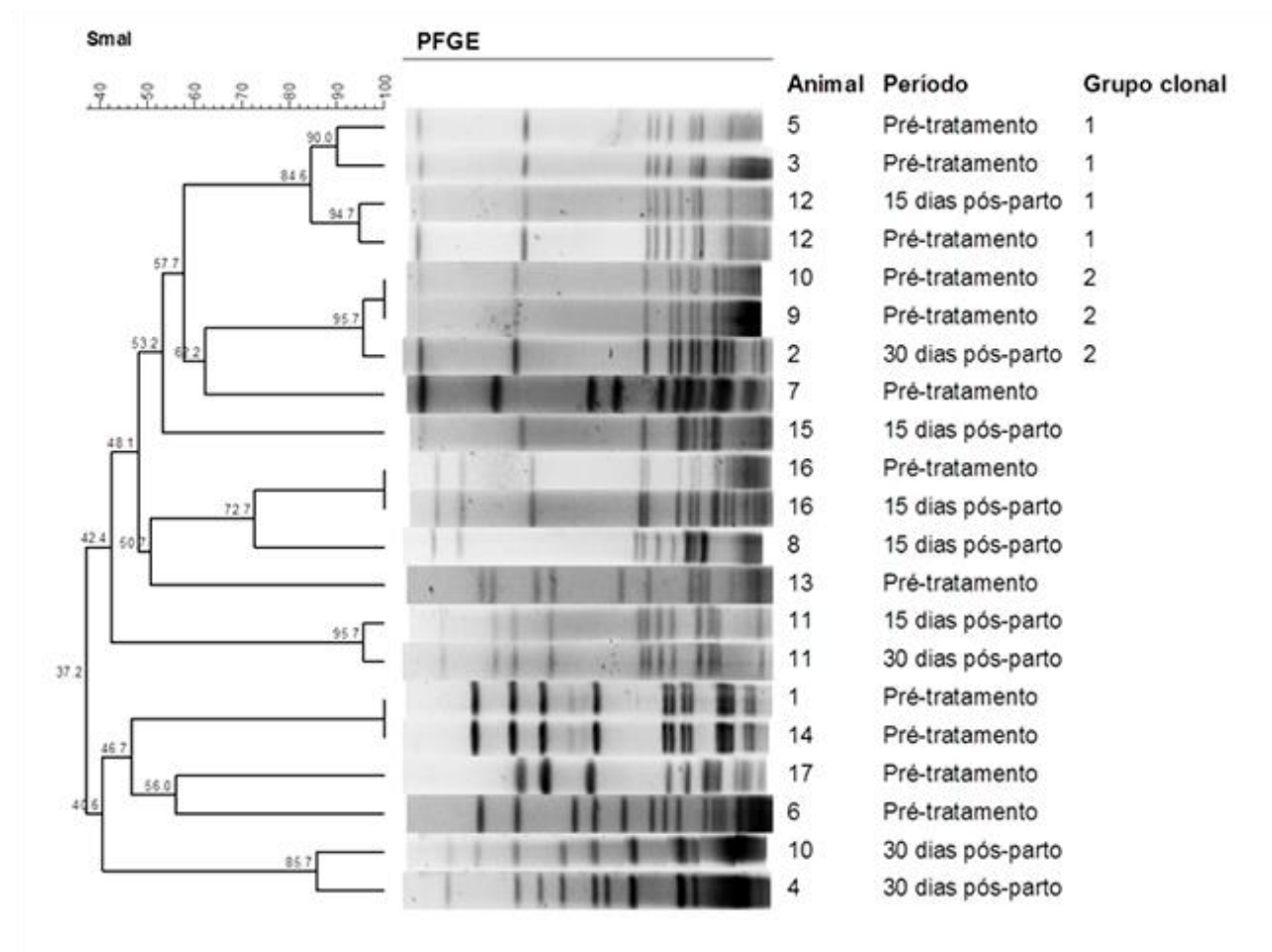


Figura 2. Dendrograma gerado pela análise dos perfis PFGE – Smal de isolados de *Staphylococcus simulans* (similaridade $\geq 80\%$), antes da secagem e após o parto na lactação consecutiva.

Somente um grupo clonal foi identificado para as estirpes de *S. epidermidis* (Figura 3), correspondente à metade dos isolamentos desta espécie que foram investigados.

A maioria dos isolados identificados como pertencentes ao mesmo grupo clonal estava presente antes do tratamento, o que poderia significar que estes micro-organismos foram mais suscetíveis ao tratamento antimicrobiano ou à resposta imunológica do animal no combate à infecção, nos casos de animais não tratados. Esses resultados são interessantes, já que a produção de biofilmes por espécies coagulase-negativas foi classificada como rara, porém, segundo Simojoki et al.(20), é mais comum em *S. epidermidis* que em outras espécies. Demais micro-organismos dessa espécie que não pertenciam a um mesmo grupo clonal sugerem uma distribuição ampla no rebanho em diferentes fontes de contaminação ou infecção. Segundo Onni et al.(22), *S. epidermidis* podem apresentar elevada adaptação ao ambiente.

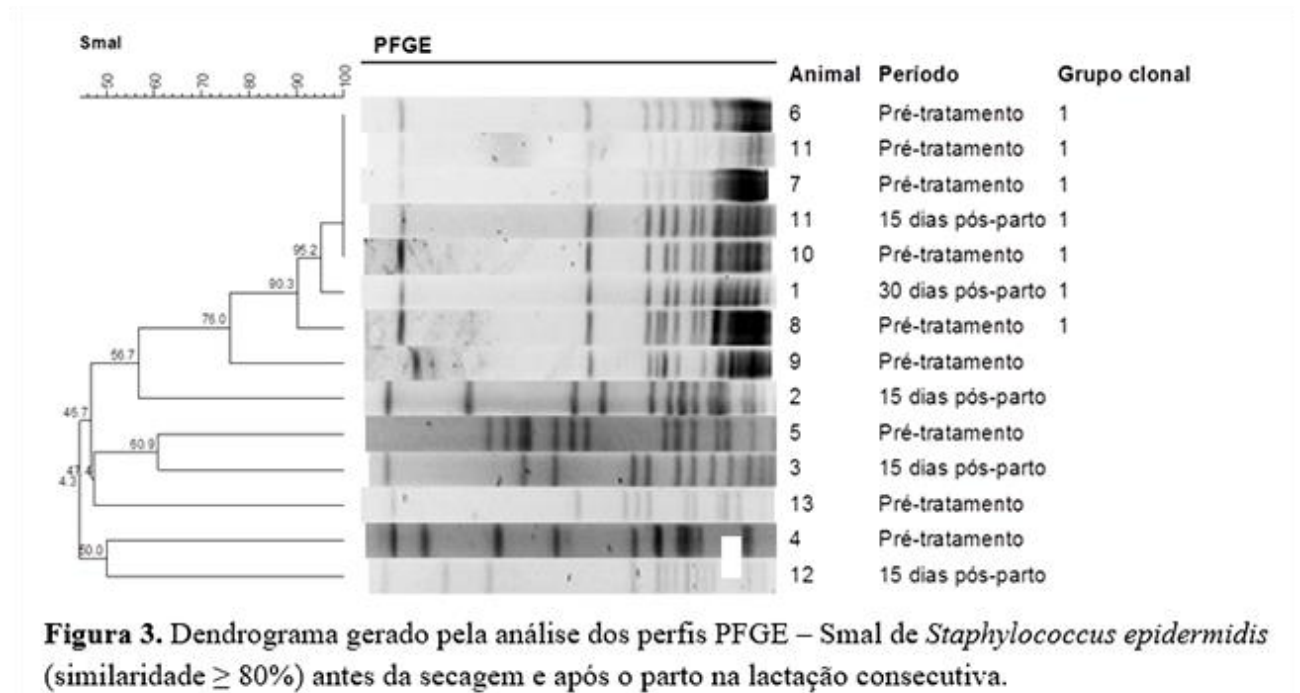


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise dos perfis PFGE – SmaI de *Staphylococcus epidermidis* (similaridade $\geq 80\%$) antes da secagem e após o parto na lactação consecutiva.

O estudo da persistência de espécies de SCN no interior da glândula mamária em ovelhas durante o período seco pode contribuir com o estabelecimento de futuras medidas de controle em diferentes rebanhos. A manutenção de um ambiente higiênico apresenta relevância dentre as medidas de prevenção da mastite, sem o qual outras medidas como o tratamento na secagem da ovelha podem ser ineficazes, seja pela manutenção do micro-organismo no interior da metade mamária ou pela permanência de fontes de contaminação no ambiente que podem proporcionar a reinfecção da ovelha.

Apesar de Pereira et al.⁽²³⁾ terem investigado fatores de risco para a forma clínica da mastite e não a subclínica, estes autores defendem que a manutenção de fêmeas doentes junto a sadias pode contribuir para o aumento do número de casos da doença, pois os cordeiros possuem o hábito de mamar em outras ovelhas além da sua mãe, o que pode acontecer também em animais com mastite subclínica. Adicionalmente, outros fatores podem interferir no controle da doença, como um sistema de criação mais intensivo e a ausência de limpeza das instalações, citados também por estes autores. Consequentemente, podem afetar também a cura após o tratamento antimicrobiano.

Conclusões

Staphylococcus warneri, *S. simulans* e *S. epidermidis* foram as principais espécies de SCN isoladas ao final da lactação e no pós-parto da lactação consecutiva em ovelhas com mastite. O tratamento da mastite subclínica no final da lactação não eliminou todas as espécies de SCN no pós-parto. Medidas conjuntas ao tratamento na secagem devem ser estabelecidas para colaborar com o controle da mastite subclínica em ovelhas, sobretudo quando os animais apresentam um extenso período seco.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo Fapesp n° 2012/23044-0).

Referências

1. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2007;68(1-2):145-153.
2. Anderson DE, Hull BH, Pugh DG. Enfermidades da glândula mamária. In: Pugh DG, ed. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: Roca; 2004. p. 379-399.
3. Marogna G, Roselu S, Lollai S, Tola S, Leori G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Research*. 2010;88(2-3):119-125.
4. Veríssimo CJ, Zafalon LF, Otsuk IP, Nassar AFC. Prejuízos causados pela mastite em ovelhas Santa Inês. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2010;77(4):583-591.
5. Naccari F, Martino D, Giofrè F, Passantino A, De Montis P. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. *Small Ruminant Research*. 2003;47(1):1-9.
6. Blagitz G, Batista CF, Souza FN, Benites NR, Melville PA, Stricagnolo CR, et al. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28(9):417-422.
7. Bolsanello RX, Hartman M, Domingues PF, Mello Júnior AZ, Langoni H. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedade de Botucatu, SP. *Veterinária e Zootecnia*. 2009;16(1):221-227.
8. Pengov A. The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 2001;84(3):572-574.
9. Pradié J, Moraes CR, Gonçalves M, Vilanova MS, Corrêa GF, Lauz OG, et al. Somatic cell count and California Mastitis Test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2012;40(2):1038.
10. Mavrogianni VS, Cripps PJ, Brooks H, Taitzoglou IA, Fthenakis GC. Presence of subepithelial lymphoid nodules in the teat of ewes. *Anatomia, histologia, embryologia*. 2007;36(3):168-171.
11. Bergey DH, Holt JC. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. 984 p.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.1465 p.
13. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. I. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(9):3099-3103.
14. McDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. 2001;40(3):245-254.
15. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(11):5113-5120.

16. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(9):5275-5293.
17. Dall Agnol AM, Cavalcante MB, França CA, Krewer CC, Queirós AA, Costa MM, et al. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013;34(1):311-322.
18. Veh KA, Klein RC, Ster C, Keefe G, Lacasse P, Scholl D, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(1):155-168.
19. Kiossis E, Brozos CN, Petridou E, Zdragas A, Papadopoulos T, Boscós C. Study on the possible survival of *Staphylococcus chromogenes* through the dry period in dairy ewes. *Small Ruminant Research*. 2013;115(1-3):124-129.
20. Simojoki H, Hyvönen P, Plumed Ferrer C, Taponen S, Pyörälä S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology*. 2012;158(3-4):344-352.
21. 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*. 2007;90(7):3301-3307.
22. Onni T, Sanna G, Larsen J, Tola S. Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 2011;148(1):45-50.
23. Pereira PFV, Stotzer ES, Pretto-Giordano LG, Müller EE, Lisbôa JAN. Fatores de risco, etiologia e aspectos clínicos da mastite em ovelhas de corte no Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34(1):1-10.