

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DA PREDNISOLONA ASSOCIADA À CEFOPERAZONA NO
TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DE CASOS NATURAIS DE MASTITE
CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

ANANDA FINCO RAPOSO FRANCO

Botucatu – SP

Dezembro, 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DA PREDNISOLONA ASSOCIADA À CEFOPERAZONA NO
TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DE CASOS NATURAIS DE MASTITE
CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

ANANDA FINCO RAPOSO FRANCO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Franco, Ananda Finco Raposo.

Eficácia da prednisolona associada à cefoperazona no tratamento intramamário de casos naturais de mastite clínica em vacas leiteiras / Ananda Finco Raposo Franco. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja

Capes: 21202001

1. Bovino de leite - Doenças. 2. Mastite bovina.
3. Prednisolona. 4. Glicocorticoides. 5. Cefoperazona.

Palavras-chave: Cefoperazona; Glicocorticoides; Mastite clínica; Prednisolona; Vacas leiteiras.

Nome do Autor: Ananda Finco Raposo Franco

Título: EFICÁCIA DA PREDNISOLONA ASSOCIADA À CEFOPERAZONA NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DE CASOS NATURAIS DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. André Thaler Neto
Membro
Departamento de Zootecnia
Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) – UDESC – Lages, SC.

23 de dezembro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha avó Helena (em memória) pelo eterno incentivo e esforço que fez durante a sua vida para que eu pudesse investir em minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tamanha bondade e misericórdia em relação a minha vida e da minha família. Aquele que é o Autor da vida, que me sustenta e me alimenta com força e sabedoria para que eu possa caminhar dia após dia, sob sua vontade e soberania. Toda a glória para Ele.

Agradeço ao meu marido, Michel, por principalmente me ensinar a caminhar nas mais difíceis estradas deslumbrando as mais belas paisagens junto Daquele que nos dá o verdadeiro sentido da Vida, nosso Senhor Jesus Cristo. Por conduzir e sustentar nossa família de forma sábia, leve, com temor ao Senhor, e por me incentivar e ajudar a enfrentar cada desafio.

Agradeço aos meus pais, Helder e Solange, por escolherem doar toda forma de amor que encontraram durante a vida. Espero um dia experimentar desse amor insano que os pais sentem pelos filhos, algo sobrenatural, divino, e que nos mostra ainda mais do amor de Deus por nós. Sou eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim e para mim.

Agradeço aos meus avós, Helena (em memória) e Polidório, por tamanha dedicação para que eu pudesse chegar até aqui hoje. Meu coração transborda de alegria, gratidão, amor e constrangimento por ver tudo que fizeram por mim durante toda a minha vida. É sobrenatural. À minha eterna avó Helena, fica uma imensa saudade e tristeza em não a ter aqui conosco presenciando esses momentos que tanto sonhava. Mas, tenho a certeza de que está em um lugar muito melhor, com o nosso Senhor Jesus, provando das melhores coisas de tudo que já existiu.

À minha irmã Marina, que está sempre me ensinando sobre amizade e amor, acalmando meu coração nos momentos necessários e servindo de aconchego nos momentos difíceis.

À minha mais nova família Franco, por todo o carinho e amor com qual me adotaram desde sempre e para sempre, repleto de momentos especiais e únicos.

Ao meu orientador Prof. José Pantoja, por tudo que me ensinou não apenas no âmbito profissional, mas também sobre os valores pessoais, como humildade, sinceridade, simplicidade e honestidade. Levo esses ensinamentos comigo com muita gratidão. Além disso, agradeço pelos inúmeros ensinamentos técnicos e

profissionais, por toda paciência durante o período de trabalho, e principalmente, por alavancar minha carreira profissional. Não estaria aqui se não fosse por ele.

Aos meus colegas de pós-graduação, Giulia, Fábio e Tamiris, por todo o auxílio, principalmente nessa reta final, que em momento algum negaram ajuda, e tornaram a caminhada mais bonita e especial.

Aos amigos e irmãos que Botucatu me deu ao longo dos últimos anos. Sem eles, a jornada não seria a mesma. Em especial, gostaria de agradecer aos meus irmãos em Cristo, Guilherme e Antone, que me ajudaram muito durante o mestrado e disciplinas com as questões de escrita e estatísticas, e claro, com muitas orações.

À instituição FMVZ-UNESP Botucatu pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos proprietários, funcionários e veterinários, em especial ao M.V. André Oliveira, colaborador desse projeto de mestrado que não só auxiliou com as fazendas participantes, mas em todo o processo da minha vida profissional, abrindo caminhos e novas oportunidades.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou o projeto e concedeu a bolsa de mestrado durante grande parte do período (diante do protocolo 0081/2018).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Características dos casos de mastite clínica (MC) após alocação aleatória em dois grupos experimentais	38
Tabela 2. Distribuição de microrganismos isolados de casos de mastite clínica, por grupo, na detecção (D0), 14 (D14) e 21 (D21) dias após a detecção do caso.....	40
Tabela 3. Estatísticas descritivas para resultados de saúde do úbere, por grupo	42
Tabela 4. Investigação bivariada de fatores associados ao tempo para cura clínica e risco de cura microbiológica	43

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Fluxograma de dados faltantes e número total de observações usadas para a análise de cada desfecho do estudo. PCEF: os quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) e prednisolona (4 mg) no dia da detecção de MC (D0) e 48 horas depois. CEF: quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) no dia da detecção de MC (D0), e 48 horas depois.....45

Figura 2. Curvas de sobrevivência representando tempo de cura clínica (painel superior) e tempo de recorrência (painel inferior), até o 6º (cura clínica) ou 90º (recorrência) dia após a detecção do caso. PCEF: os quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) e prednisolona (4 mg) no dia da detecção de MC (D0) e 48 horas depois. CEF: quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) no dia da detecção de MC (D0), e 48 horas depois.....46

Figura 3. Médias dos quadrados mínimos para a contagem de células somáticas em nível de quarto ($\log_{10}$ células / mL) entre os tratamentos, aos 14 e 21 dias após a detecção do caso. PCEF: os quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) e prednisolona (4 mg) no dia da detecção de MC (D0) e 48 horas depois. CEF: quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) no dia da detecção de MC (D0), e 48 horas depois.....47

Figura 4. Médias dos quadrados mínimos para contagem de células somáticas em nível de vaca ($\log_{10}$ células / mL) ou produção de leite (kg / vaca / dia) entre os tratamentos, no 1º, 2º e 3º testes mensais após a detecção de MC. PCEF: os quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) e prednisolona (4 mg) no dia da detecção de MC (D0) e 48 horas depois. CEF: quartos receberam uma infusão intramamária de cefoperazona (250 mg) no dia da detecção de MC (D0), e 48 horas depois.....48

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AINE = Anti-inflamatórios não esteroidais

CCS = Contagem de células somáticas

IIM = Infecção intramamária

IMM = Intramamário

IM = Intramuscular

MC = Mastite clínica

MSC = Mastite subclínica

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
CAPÍTULO 2 – Trabalho científico	16
RESUMO.....	18
CAPÍTULO 3.....	50
DISCUSSÃO GERAL	50
CONCLUSÃO GERAL.....	52
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO I	61
ANEXO II – Normas de publicação da revista Livestock Science	65

FRANCO, A.F.C. **Eficácia da prednisolona associada à cefoperazona no tratamento intramamário de casos naturais de mastite clínica em vacas leiteiras.** Botucatu, 2020. 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da associação entre cefoperazona e prednisolona no tratamento de casos naturais de mastite clínica (MC) em bovinos leiteiros durante a lactação. Animais de 14 rebanhos comerciais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, denominados como: 1) grupo PCEF: receberam tratamento intramamário contendo 250 mg de cefoperazona e 4 mg de prednisolona a cada 48h, totalizando 2 aplicações (N=147) e 2) grupo CEF: tratados somente com cefoperazona, conforme tratamento do grupo PCEF (N=141). Foram coletadas amostras de leite para cada quarto mamário incluído no estudo no dia da detecção do caso (D0), e 14 (D14) e 21 (D21) dias após D0, para realização de diagnóstico microbiológico e contagem de células somáticas (CCS). Os desfechos estudados foram cura microbiológica, cura clínica, recorrência de MC, risco de novas IMI em D14 e D21, CCS em D14 e D21 e produção de leite e CCS no 1º, 2º e 3º exames mensais após MC. Um total de 288 casos de MC foram randomizados em PCEF (n = 147) ou CEF (n = 141). A cura clínica (PCEF = 81,63% e CEF = 82,27%) e o tempo mediano (1º - 3º quartil) até a cura clínica [PCEF = 3,0 (2,5-4,0 dias) e CEF = 3,50 (3,0-4,0) dias] não foram diferentes entre os tratamentos. O risco de cura clínica foi 1,86 (IC 95%: 1,38-2,51) vezes maior para os casos leves, em relação aos moderados. A cura microbiológica (PCEF = 68,87% e CEF = 54,21%) não diferiu entre os tratamentos. Os casos associados a patógenos Gram-negativos foram 5,40 (IC 95%: 1,84-15,91) vezes mais propensos a serem curados do que aqueles associados a patógenos Gram-positivos. A recorrência de MC (PCEF = 26,67% e CEF = 21,93%) e o tempo mediano até a recorrência (PCEF = 63,5 e CEF = 65 dias) não diferiram entre os tratamentos. Para os casos com cultura negativa em D0, a incidência de nova IMI em D14 (PCEF = 18,75% e CEF = 34,78%) e D21 (PCEF = 28,13% e CEF = 39,13%) não foi diferente entre os tratamentos. A CCS foi numericamente maior em CEF do que em PCEF em D14 e D21, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente

significantes. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significantes entre a CCS ou a produção de leite no 1º, 2º e 3º teste mensal após o caso de MC. Os resultados deste estudo indicam que o tratamento intramamário de casos naturais de MC com PCEF não foi superior ao tratamento com CEF, com base no risco de cura clínica e microbiológica, recorrência de MC, risco de nova IMI, produção de leite e CCS.

Palavras-chave: mastite clínica, vacas leiteiras, prednisolona, glicocorticoides, cefoperazona.

FRANCO, A.F.C. **Efficacy of a combination of prednisolone and cefoperazone for intramammary treatment of natural cases of clinical mastitis in dairy cows.** Botucatu, 2020. 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficacy of a combination of cefoperazone and prednisolone for treatment of natural cases of clinical mastitis (CM) in dairy cattle. Cows from 14 commercial herds were randomly assigned to two experimental groups, as follows: 1) PCEF: received intramammary treatment (IMM) containing 250 mg of cefoperazone and 4 mg of prednisolone every 48 hours, totaling 2 applications (N = 143) and 2) CEF: treated only with cefoperazone, as previously described (N = 130). Milk samples were collected for each mammary quarter included in the study on the day of detection of the case (D0), and 14 (D14) and 21 (D21) days after D0, to perform microbiological diagnosis and somatic cell count (SCC). The outcomes were microbiological cure, clinical cure, recurrence of CM, risk of new IMI at D14 and D21, SCC at D14 and D21, and cow-level milk production and SCC at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after CM. A total of 288 CM cases were randomized into PCEF (n = 147) or CEF (n = 141). Clinical cure (PCEF = 81.63% and CEF = 82.27%) and the median (1st - 3rd quartile) time to clinical cure [PCEF = 3.0 (2.5-4.0 days) and CEF = 3.50 (3.0-4.0) days] were not different between the treatments. The risk of clinical cure was 1.86 (95% CI: 1.38-2.51) times higher for mild cases, as compared with moderate cases. Microbiological cure (PCEF = 68.87% and CEF = 54.21%) was not different between the treatments. Cases associated with Gram-negative pathogens were 5.40 (95% CI: 1.84-15.91) times more likely to cure than those associated with Gram-positive pathogens. Recurrence of CM (PCEF = 26.67% and CEF = 21.93%) and the median time to recurrence (PCEF = 63.5 and CEF = 65 days) were not different between the treatments. For culture-negative quarters at D0, the incidence of new IMI at D14 (PCEF = 18.75% and CEF = 34.78%) and D21 (PCEF = 28.13% and CEF = 39.13%) were not different between the treatments. Quarter milk SCC was numerically higher in CEF than in PCEF at D14 and D21, although the differences were not statistically

significant. Likewise, no significant differences were found between cow-level SCC or milk production at the 1st, 2nd, and 3rd monthly DHI test after CM. The results of this study indicate that intramammary treatment of natural CM cases with PCEF was not superior to treatment with CEF, based on the risk of clinical and microbiological cure, CM recurrence, risk of new IMI, milk production, and SCC.

Key Words: clinical mastitis, dairy cows, prednisolone, glucocorticoids, cefoperazone.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a doença mais prevalente em rebanhos leiteiros no mundo todo, resultando em prejuízos econômicos (HEIKKILÄ et al., 2012; ROLLIN et al., 2015), comprometimento do bem-estar animal (BEA) (LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012; PETERS et al., 2015), e risco à saúde pública.

A forma clínica da doença afeta 24 a 35% das vacas anualmente (OLIVEIRA et al., 2015; SANTMAN-BERENDS et al., 2015; LEVISON et al., 2016) e o custo de um único caso foi estimado entre US\$ 161 a US\$ 444 (HALASA et al., 2007; HUIJPS et al., 2008; ROLLIN et al., 2015), incluindo a redução da produção leiteira, descarte de leite e comprometimento da qualidade (devido ao aumento nas concentrações de células somáticas e bactérias totais) além de outros custos como fármacos, mão de obra, infertilidade, transmissão para outras vacas e aumento do risco de morte ou descarte involuntário (HERTL et al., 2014; DETILLEUX et al., 2015; ROLLIN et al., 2015).

A mastite clínica (MC) também impacta diretamente o BEA. Fogsgaard et al. (2015), demonstraram que a alteração de comportamento foi evidente em vacas leiteiras com MC leve de ocorrência natural. Vacas com MC ingeriram menos ração (41,0 kg/d) e permaneceram menos tempo deitadas (732 min/d) quando comparadas com as vacas sem MC (43,5 kg/d e 756 min/d, respectivamente), e demonstraram maior ocorrência de comportamentos indesejáveis, tais como elevação das patas traseiras e coices durante a ordenha. Ademais, a MC é uma das principais razões do uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (NOBREGA et al., 2017; REDDING et al., 2019) e, consequentemente, de violações devido à presença de resíduos de medicamentos no leite (ROBERSON, 2012; ROYSTER; WAGNER, 2015).

O uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal tem levado ao desenvolvimento de organismos resistentes a inúmeros antimicrobianos utilizados na medicina humana (SILBERGELD et al., 2008; LANDERS et al., 2012), aumentando a pressão da sociedade para o desenvolvimento de

programas que visem o uso racional destes medicamentos em propriedades rurais.

Dessa forma, em um cenário caracterizado pela emergência da MC em rebanhos leiteiros modernos, é importante destacar uma maior relevância que a MC ambiental possui uma vez que o controle de MC contagiosa tenha sido realizado, tornando-a como um dos maiores desafios para essas fazendas.

Portanto, pelo aumento da pressão da sociedade para a diminuição do uso de antimicrobianos e melhoria do BEA (CARDOSO et al., 2016), o desenvolvimento de novos protocolos que resultem em maior eficácia terapêutica e melhores condições de BEA são necessários para a sustentabilidade em longo prazo da pecuária leiteira.

Alguns pesquisadores têm investigado os efeitos dos glicocorticoides no tratamento da MC e demonstraram, em condições experimentais, que a sua utilização pode contribuir para a cura clínica e bacteriológica, além de amenizar os sinais clínicos da inflamação (ANDERSON; HUNT, 1989; SIPKA et al., 2013; WELLNITZ et al., 2014). Entretanto, é importante notar que os estudos publicados até o momento foram realizados a partir de infecções induzidas experimentalmente, e que o tratamento foi instituído antes do aparecimento dos sinais clínicos. Em condições de campo, a manifestação dos sinais clínicos pode ocorrer até aproximadamente 12 a 24 h após a infecção (ROBERSON, 2012), o que resultaria no tratamento em um momento caracterizado por uma reação inflamatória já estabelecida na glândula mamária. Dessa forma, estudos são necessários para avaliar a eficácia de anti-inflamatórios esteroides no tratamento de casos naturais de MC.

O objetivo dessa dissertação foi avaliar a eficácia da associação de cefoperazona e prednisolona no tratamento de casos naturais de MC de bovinos leiteiros durante a lactação, testando as hipóteses de que o tratamento intramamário (IMM) de MC com cefoperazona e prednisolona resultará em maiores taxas de cura bacteriológica e clínica, assim como retorno mais rápido da contagem de células somáticas (CCS) ao nível basal, do que o tratamento IIM com apenas cefoperazona.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite clínica

A mastite é uma reação inflamatória na glândula mamária, predominantemente resultante de infecção bacteriana, caracterizada como a doença mais comum em rebanhos leiteiros no contexto mundial. Além de ser complexa e multifatorial, o leite de vacas infectadas apresenta alterações físico-químicas e aumento da CCS no leite cru.

Na forma clínica da doença, observa-se alterações na aparência do leite (consistência, cor e viscosidade), as quais podem ser acompanhadas por sinais inflamatórios como edema, calor, rubor, dor e perda de função da glândula mamária. A MC pode ser classificada por graus de gravidade (grau 1: leve, grau 2: moderado e grau 3: grave) (WENZ et al., 2001). Casos leves são definidos quando há somente alterações na aparência do leite. Nos casos moderados, ocorrem alterações na aparência do leite acompanhadas de sinais clínicos no quarto mamário, enquanto os casos graves são definidos quando há todos os sinais supracitados, acompanhados de alterações sistêmicas (WENZ et al., 2001), necessitando de intervenção terapêutica imediata.

2.1.2. Impacto econômico e uso de antimicrobianos na produção leiteira

Ao analisar os principais prejuízos causados pela mastite em rebanhos leiteiros no mundo todo, observa-se que grande parte são devidos à redução na produção de leite (SEEGERS et al., 2003), descarte do leite com resíduos de antimicrobianos (HALASA et al., 2007), perda de qualidade (MA et al., 2000), abate precoce (HEIKKILA et al., 2012), custo com medicamentos e serviços veterinários, riscos de outras doenças e risco de transmissão de mastite aos animais saudáveis (HALASA et al., 2007).

A principal razão para o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras se deve ao tratamento de mastites (NOBREGA et al., 2017; REDDING et al., 2019), que em larga escala gera preocupações devido ao risco de contaminação do leite com resíduos de tais drogas e o desenvolvimento de microrganismos

resistentes a inúmeros antimicrobianos utilizados em medicina humana (OLIVER e MURINDA, 2012). Nos Estados Unidos somente duas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e lincosamidas) são permitidas pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de mastite.

No Brasil, não está disponível uma legislação bem definida sobre o uso específico de antimicrobianos para o tratamento de mastite em vacas leiteiras. Certos princípios ativos com grande potencial de geração de resíduos na carne e leite, tais como gentamicina (MARTINS et al., 2016) e listados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como de importância crítica para o uso em medicina humana (OMS, 2017), tais como cefalosporinas de terceira e quarta geração, macrolídeos e quinolonas, são aprovados para uso em vacas lactantes e amplamente utilizados no Brasil. Assim, o uso indiscriminado de antimicrobianos gera preocupação emergente, de âmbito global na medicina humana com o aumento de organismos resistentes, dificultando tratamentos essenciais em pessoas sujeitas às diferentes infecções. Ademais, é preciso salientar que, atualmente, a sociedade vem exigindo o uso controlado de antibióticos em propriedades rurais e exigindo produtos de maior qualidade e procedência comprovada.

2.1.3. Tratamento de mastite clínica

A grande maioria dos casos de MC é tratada imediatamente após o início dos sinais clínicos, sem o conhecimento prévio do agente causador (OLIVEIRA; RUEGG, 2014). Essa conduta impulsionou a indústria farmacêutica a desenvolver antimicrobianos intramamário (IMM) de amplo espectro com o intuito de abranger um número maior de possíveis agentes etiológicos (BRADLEY; GREEN, 2009).

O tratamento dos casos de MC leves e moderados geralmente é realizado somente com antimicrobiano IMM. Nos EUA, um estudo quantificou o uso desses medicamentos em fazendas convencionais e orgânicas de Wisconsin, nas quais o tratamento de MC resultou em 55% do seu uso total (Pol e Ruegg (2007). Em estudo similar, incluindo 589 vacas e 51 rebanhos também em Wisconsin, EUA, Oliveira e Ruegg (2014) reportaram que 72,9 e 67,6% das vacas com MC leve e

moderada, respectivamente, foram tratadas somente através de infusão IMM, com tempo mediano de duração de quatro dias. As bases terapêuticas mais utilizadas foram ceftiofur (71,6%), cefapirina (15,7%), pirlimicina (5.1%), amoxicilina (4.3%) e hetacilina (3.3%). No entanto, 43,8% dos casos severos de MC foram tratados com associação de antimicrobianos IMM e sistêmicos (ampicilina, ceftiofur, oxitetraciclina, sulfadimetoxina e florfenicol).

Para o tratamento de MC no Brasil e no mundo, diversos antimicrobianos tem sido utilizado, especialmente aqueles que possuem via de administração IMM, mas poucos estudos avaliaram estratégias modernas para protocolos em grandes fazendas (Pol e Ruegg, 2007). A eficácia dos tratamentos está relacionada com o grau da lesão do parênquima mamário e ao patógeno envolvido. Quanto maior a eficiência desses medicamentos no que se refere à eliminação rápida dos microrganismos causadores de mastite, menor é o impacto na saúde da glândula mamária, aumentando a chance de recuperação das vacas. Pol e Ruegg (2007) e Stevens et al., (2016) descreveram em seus estudos que os antimicrobianos a base de cefalosporinas são os compostos mais utilizados nos tratamentos de IIM em rebanhos leiteiros.

Em 2014, Oliveira e Ruegg levantaram os tratamentos de 747 vacas com MC leves, moderadas ou graves em 51 fazendas leiteiras na região de Wisconsin, Estados Unidos. Neste estudo, 71,6% das vacas foram tratadas com ceftiofur IMM isoladamente ou combinado com outros antimicrobianos (administrados de forma IM ou sistêmica), destacando a relevância dos tratamentos realizados de forma local (IMM) ao lidar com casos de MC.

2.1.4. Cefalosporinas

As cefalosporinas são as classes terapêuticas mais utilizadas no tratamento da MC em propriedades leiteiras mais tecnificadas. Se caracterizam por possuírem uma ampla gama de atividade antibacteriana, mas apresentam grande diversidade entre as propriedades de seus antibacterianos, visto que são classificadas de acordo com suas “gerações”, uma vez que em cada uma dessas gerações introduzidas foram adicionadas algum nível de vantagem em relação à geração anterior (GUIGÈRE et al., 2013).

No entanto, surgiram algumas inadequações de classificação com as gerações e uma classificação expandida foi desenvolvida com base na atividade microbiana, incluindo propriedades farmacológicas e a estabilidade da beta-lactamase, que se caracterizam por serem enzimas produzidas por algumas bactérias responsáveis pela resistência a antibióticos beta-lactâmico, tais como penicilina, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemas.

As cefalosporinas são caracterizadas em: 1) Primeira geração, com atividade principal em bactérias Gram-positivas; 2) Segunda geração, com atividade tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas; 3) Terceira geração, que possuem atividade reduzida para bactérias Gram-positivas, mas aumento da atividade contra bactérias Gram-negativas e 4) Quarta geração, que possuem aumento de atividade para bactérias Gram-positivas e também Gram-negativas.

A atividade de algumas cefalosporinas em suas determinadas gerações foi estudada por ROYSTER; WAGNER (2015) e visto que a cefapirina é uma cefalosporina de primeira geração e possui espectro de ação contra as enterobactérias e maioria das bactérias Gram-positivas, incluindo os estafilococos produtores de β -lactamase. O ceftiofur e a cefquinoma são cefalosporinas de terceira e quartas gerações, respectivamente, que possuem um maior espectro de ação contra patógenos Gram-negativos, quando comparados com as cefalosporinas de primeira geração.

Outros estudos direcionados para mastite em bovinos leiteiros reportam que a taxa de cura bacteriológica geral da MC variou de 60 a 71% (LAGO et al., 2011; SCHUKKEN et al., 2013) e 32 a 73% (SHUKKEN et al. 2011; SHUKKEN et al. 2013; TRUCHETTI et al. 2014) após tratamento IMM com cefapirina e ceftiofur, respectivamente. Quando estratificada por agentes específicos, as taxas de cura de MC observadas após tratamento IMM com cefapirina variaram entre 53 e 98% (estafilococos), 57 e 79% (estreptococos ambientais), 18 e 32% (*Staphylococcus aureus*), 45 e 83% (*E. coli*) e 44 e 86% (*Klebsiella* spp) (LAGO et al., 2011 e SCHUKKEN et al., 2013). Quanto ao ceftiofur, as taxas de cura reportadas variaram entre 0 e 50% (*S. aureus*), 62 e 80% (estreptococos ambientais), 98% (estafilococos coagulase-negativa), 61 a 78% (*E. coli*) e 44,7

e 62% (*Klebsiella* spp) (SHUKKEN et al., 2011; SHUKKEN et al., 2013; TRUCHETTI et al., 2014).

2.1.4.1. Cefoperazona

A cefoperazona é uma cefalosporina de terceira geração que se caracteriza por amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, possuem propriedades não irritantes, estabilidade da beta-lactamase e alta persistência em quartos mamários tratados após uma administração única (Barragry, 1994; Prescott, 2006). Foi aprovada como infusão intramamária para o controle de infecções da glândula mamária de bovinos leiteiros causadas por estafilocos, estreptococos e *Escherichia coli*, sendo o regime de dosagem de 250 mg por quarto afetado em aplicação única, ou 100 mg por quarto afetado em aplicação dupla e intervalo de 24 horas (EMEA, 1998).

Para avaliar a eficácia clínica de 250 mg de cefoperazona em IMM de bovinos leiteiros, Wilson et al., (1986) compilou os dados de quatro ensaios clínicos realizados a campo em países como Dinamarca, França, Suécia e Reino Unido, investigando um total de 597 casos de MC e observaram uma taxa média de cura clínica de 82,4%, com um limite superior de 89,6% na França e inferior de 77% no Reino Unido.

Wilson et al., (1986) avaliaram a eficácia de uma dose única de 250 mg de cefoperazona em uma suspensão de óleo via IMM em outro ensaio clínico a campo com um total de 597 casos de MC ocasionados naturalmente na Suécia, Dinamarca, França e Reino Unido e determinou uma taxa de cura clínica de 82% e uma taxa de cura bacteriológica de 69%, o que demonstra certa eficiência relacionada a um medicamento de dose única, uma vez que fornece mais praticidade com um tratamento simples e mais curto.

Na medicina veterinária, a susceptibilidade antimicrobiana obtida por laboratórios de diagnóstico é destinada para fornecer opções terapêuticas. Para isso, prefere-se estabelecer pontos de corte clínicos ao invés de epidemiológicos para obtenção de previsões da probabilidade de um tratamento de sucesso

(Bywater et al., 2006; Simjee et al., 2008). Os pontos de corte clínico específicos para a medicina veterinária estão disponíveis para vários agentes microbianos e geralmente levam em conta a espécie animal e condições de doença do mesmo (CLSI, 2008).

No caso da mastite bovina, o ponto de corte específico foi estabelecido e aprovado pelo Subcomitê de Suscetibilidade a Antimicrobianos Veterinários (V-AST) do CLSI para a combinação de penicilina e novobiocina, para a cefalosporina de terceira geração, como ceftiofur e a lincosamida pirlimicina (CLSI, 2008), porém, não há critérios para avaliar a susceptibilidade de forma confiável ou a resistência à cefoperazona especificamente na medicina veterinária.

2.2. Imunologia e inflamação da glândula mamária

O sistema imunológico de qualquer ser vivo é essencial para proteção e prevenção de doenças. Quando um microrganismo invade o tecido da glândula mamária, o sistema imunológico inato o reconhece e inicia um processo inflamatório como forma de responder a esse invasor e defender o organismo como um todo, constituindo a principal linha de defesa durante os estágios iniciais da infecção, sendo este, um fator determinante do resultado final da mastite (Sordillo et al., 2011). Estes mecanismos de defesa inatos podem ser já preexistentes, porém, só são ativados quando expostos aos microrganismos.

Pode-se observar uma grande variação de tipos de resposta por animal, como por exemplo a eficiência desse mecanismo de defesa em que os patógenos podem ser eliminados em poucos minutos ou até horas após a invasão, sendo que no caso de eliminações rápidas, a glândula mamária e a qualidade do leite terão poucas alterações perceptíveis, diferente do que acontece com as eliminações mais tardias de microrganismos (Sordillo et al., 2011). Esse fato provavelmente relaciona-se às grandes mudanças em que os rebanhos leiteiros têm passado, como por exemplo a seleção genética de animais para alta produção. Ademais, sabe-se que quanto maior a produção de uma vaca, mais casos de mastite ela será predisposta a enfrentar, como no estudo do Barnouin et al. (2005) onde relataram a incidência de MC em vacas

de alta produção de leite (média anual > 8,130 Kg/lactação) de 1,3 vezes maior do que a incidência de MC em vacas de média produção de leite (média anual < 6,705 Kg).

Dessa forma, diversos mecanismos do sistema de defesa inato são realizados pela glândula mamária para evitar a entrada de um microrganismo. Entre eles, destacam-se receptores de reconhecimento padrão, fagócitos (neutrófilos e macrófagos), moléculas solúveis com propriedades bactericidas e bacteriostáticas como lactoferrina, complemento, lisozima, citocinas, imunoglobulinas (ig) e o próprio esfíncter do canal do teto, que é capaz de criar uma barreira física por meio do seu estreitamento, dificultando a penetração de patógenos. Além disso, Sordillo et al., (1997) relata que esse esfíncter possui um tampão de queratina, que é composta de ácidos graxos cuja ação é bacteriostática com proteínas que podem induzir a morte dos microrganismos.

Considerando uma glândula mamária saudável, é normal encontrarmos células como linfócitos e macrófagos, e em menor quantidade, os neutrófilos e células epiteliais (RIOLLET et al., 2000; DOSOGNE et al., 2003). Já no quarto mamário infectado, encontra-se em grande maioria os neutrófilos, cuja função é fagocitar e destruir as bactérias invasoras. Sua concentração pode variar de 50 a 95% do total de células somáticas existentes no leite (RIOLLET et al., 2000a).

Essa migração de neutrófilos da corrente sanguínea para a glândula mamária responsabiliza-se por gerar uma alteração celular e da CCS no leite (RIOLLET et al., 2000). Caso essa resposta do sistema imune seja efetiva e capaz de eliminar esses microrganismos causadores de mastite, a resposta inflamatória é interrompida e a CCS volta aos níveis basais. No entanto, se houver estabelecimento da infecção, a resposta inflamatória gerada pelo sistema imunológico e a migração de leucócitos continua iniciando uma resposta imune adaptativa.

A eficiência do sistema de defesa inato irá influenciar a ocorrência de novas infecções intramamárias, na gravidade da mastite e na sua duração, e na natureza da resposta imune adaptativa, que é desencadeada quando os mecanismos do sistema inato falham em eliminar o microrganismo em questão (Sordillo et al., 2011). A resposta imune adaptativa se caracteriza pela formação

de linfócitos específicos do antígeno e de células de memória que irão reconhecer os determinantes antigênicos específicos de um patógeno e preparar a glândula mamária para uma possível reinfecção, tornando essa próxima resposta imunológica muito mais rápida, forte e duradoura quando comparada a um sistema imunológico de resposta primária (Sordillo et al., 2011). Porém, esse tipo de resposta adaptativa pode demorar dias para se desenvolver, ao contrário da resposta inata.

O resultado das interações entre os patógenos e o animal dentro da GM é muito variável e costuma obter resultados diferentes em relação à gravidade e característica da mastite (infecções agudas ou crônicas), tipos de patógenos, por exemplo, bactérias de perfil gram-positivas ou gram-negativas costumam causar respostas diferentes na glândula mamária, além disso, fatores de virulência específicos (Sordillo et al., 2011). A resposta do animal à cada tipo de patógeno é o resultado da interação de vários tipos de células da GM, sendo seu objetivo final eliminar esses microrganismos invasores do organismo e restaurá-lo às funções normais.

No entanto, quanto mais rápida for a resposta do sistema imunológico, menos danos são causados nos tecidos da GM, ressaltando a importância da relação infecção e tempo de permanência para evitar os danos inadvertidos e restaurar a homeostase do sistema imunológico. Além disso, as moléculas solúveis são fundamentais para auxiliar na eficiência da resposta, e um exemplo clássico são as citocinas, que não são apenas críticas para funções fisiológicas, mas também conhecidas por obterem um papel essencial em todos os aspectos da inflamação e da imunidade.

As citocinas se caracterizam por uma rede de diversos grupos de proteínas produzidas por células imunes e não imunes de todo o organismo e sob diversas circunstâncias, tornando-as com uma capacidade fisiológica e imunomoduladora complexas. Segundo Sordillo et al., 2011, a maioria das citocinas possuem meia-vidas muito curtas, o que faz de suas funções e sua síntese geralmente ocorrerem de forma mais rápida, sendo capazes de influenciarem as funções celulares através de receptores de alta afinidade para cada citocina localizada nas células da GM.

Ao contrário do que as outras defesas solúveis dentro da GM, não há evidências de que as citocinas tenham funções antibacterianas, porém, desempenham um papel fundamental na defesa do animal como auxiliar nas respostas imunes inata e adaptativa, ativando a inflamação e iniciando a migração de leucócitos de sangue em tecidos infectados após o reconhecimento bacteriano por células locais (Sordillo et al., 2011).

O processo inflamatório se inicia então com as células residentes do tecido mamário, que expressam receptores de reconhecimento de padrões que são ativadas por PAMPs bacterianos e responsáveis em liberar os mediadores inflamatórios, que incluem as citocinas e os eicosanóides, iniciando a cascata inflamatória. Essas moléculas mediadoras irão aumentar a vasodilatação e consequentemente, aumenta-se o fluxo sanguíneo. Juntamente com esse fator, a permeabilidade dos vasos sanguíneos também será alterada, o que ocasionará um extravasamento dos componentes do plasma (albumina sérica, complementos e proteínas de fase aguda) em áreas localizadas de tecidos que foram afetados causando o edema (Sordillo et al., 2011). Nesse caso, as citocinas e algumas outras moléculas atuarão no aumento da adesão e na migração de leucócitos do sangue para o local da lesão, sendo os neutrófilos mais predominantes na fase de extravasamento inicial.

Os eicosanóides poderão regular vários processos inflamatórios (permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, edema, febre) e sua biossíntese ocorre através da oxigenação da gordura de ácidos através da ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) ou vias enzimáticas P450 (Sordillo et al., 2011). A via COX é composta por 2 isoformas principais: 1) COX1, que é responsável por sintetizar baixos níveis de prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂) que funcionam na manutenção das funções fisiológicas normais e homeostase vascular; e 2) COX2, responsável em ser altamente indutível a respostas de estímulos pró-inflamatórios relacionando à biossíntese dos mesmos. Sendo assim, o uso de antiinflamatórios não esteroides (AINE) podem inibir essa biossíntese de PG ao direcionar a atividade COX e são muito utilizados para tratamento de doenças inflamatórias, incluindo mastite em vacas leiteiras.

2.2.2. Uso de glicocorticóides no tratamento de mastite clínica

O efeito dos glicocorticoides na terapia IMM de MC não está bem esclarecido na literatura, sendo que o uso de anti-inflamatórios é mais comum nos casos severos. Oliveira e Ruegg (2014) reportaram que a terapia de suporte, incluindo anti-inflamatórios, foi administrada em 48, 20 e 8% dos casos de MC severa, moderada e leve, respectivamente.

Alguns pesquisadores têm investigado os efeitos dos glicocorticoides no tratamento da MC e demonstraram, em condições experimentais, que a sua utilização pode contribuir para a cura clínica e bacteriológica, além de aliviar os sinais clínicos da inflamação (ANDERSON; HUNT, 1989; SIPKA et al., 2013; WELLNITZ et al., 2014). Lohuis et al. (1988), em ensaio clínico incluindo seis vacas em lactação com MC induzida experimentalmente com cepa de *E. coli*, demonstraram efeito benéfico da administração sistêmica de 30 mg de dexametasona, reduzindo significativamente as perdas de produção de leite e os sinais locais da inflamação.

Resultados de um ensaio clínico em paralelo, incluindo 6 vacas da raça holandesa no terço médio da lactação, as quais foram desafiadas experimentalmente com uma infusão IMM de uma cepa de *E. coli*, demonstraram que a adição de 20 mg de prednisolona à 300 mg de cefapirina teve um efeito sinérgico, resultando em maior taxa de cura clínica e bacteriológica, menor reação inflamatória na glândula mamária, menor contagem de células somáticas (CCS) e ausência de isolamento bacteriano 12 h antes quando comparada com o grupo tratado somente com 300 mg de cefapirina (SIPKA et al., 2013). Já Wellnitz et al. (2014), em um ensaio clínico incluindo 5 vacas holandesas em lactação inoculadas experimentalmente com 100 mg de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, demonstraram que não houve diferença significativa, ao longo do tempo, na CCS entre o grupo não tratado e o tratado com 10 mg de prednisolona.

Uma dose sistêmica de 0,44 mg/kg de dexametasona demonstrou efeitos benéficos em MC induzida experimentalmente com endotoxina de *E. coli* em um ensaio clínico em paralelo em 7 blocos com 3 vacas em lactação em cada bloco.

A temperatura da superfície do úbere foi significativamente menor nos quartos tratados com dexametasona do que nos quartos tratados com 1,1 mg/Kg de flunixin meglumine e quartos não tratados (grupo controle) (ANDERSON; HUNT, 1989). Entretanto, é importante notar que os estudos publicados na literatura científica encontrados e utilizados para essa revisão de literatura foram realizados a partir de infecções induzidas experimentalmente, e que o tratamento foi instituído antes do aparecimento dos sinais clínicos. Em condições de campo, a manifestação dos sinais clínicos pode ocorrer até aproximadamente 12 a 24 h após a infecção (ROBERSON, 2012), o que resultaria no tratamento em um momento caracterizado por uma reação inflamatória já estabelecida na glândula mamária.

Dessa forma, estudos são necessários para avaliar a eficácia de anti-inflamatórios esteroides no tratamento de casos naturais de MC. Nos casos de inflamação aguda os glicocorticoides reduzem a permeabilidade vascular inibindo o ingresso de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos nos tecidos. Também suprimem a imunidade mediada por células através de diversos mecanismos, inclusive pela redução do número de leucócitos circulantes (ERRANTE et al., 2014). Sipka et al. (2013) relataram que a adição de 20 mg de prednisolona à 300 mg de cefapirina resultou na diminuição da concentração de leucócitos na glândula mamária e no leite, contribuindo para o restabelecimento mais rápido da qualidade do leite. Os resultados demonstraram uma diminuição significativamente maior no nível de recrutamento de células de defesa no grupo tratado com a associação de prednisolona e cefapirina, quando comparado com o grupo tratado somente com cefapirina.

A infusão IMM de 10 mg de prednisolona em quartos inoculados experimentalmente com LPS de *E. coli* reduziu os danos celulares e diminuiu o rompimento da barreira sangue-leite, relatando que a atividade da lactato desidrogenase (enzima indicadora de lesão tecidual) e a presença de constituintes do sangue no leite, tal como a albumina sérica, foi significativamente maior no grupo não tratado do que no grupo tratado, sugerindo que estes resultados podem influenciar o grau de severidade e a cura da MC (WEELNITZ et al., 2014).

Os glicocorticoides também atuam na modulação da síntese e na liberação de diversos mediadores da inflamação, tais como prostaglandinas, leucotrienos, histamina, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 etc), moléculas de adesão leucócitoendotélio, fragmentos de complemento e fator ativador de plaquetas (ERRANTE et al., 2014). Sipka et al. (2014), reportaram menor concentração de mediadores da inflamação, IL-4, no grupo tratado com prednisolona e cefapirina quando comparado com o tratado somente com cefapirina.

Em outro estudo também realizado por Sipka et al. (2014), os quartos tratados com 300 mg de cefapirina mais 20 mg prednisolona tiveram menores níveis de quimiocinas (CXCL2 pg/mL) após 18 h de tratamento e menor concentração de polimorfonucleares no tecido da glândula mamária quando comparados com os quartos tratados somente com 300 mg de cefapirina, podendo indicar redução no dano tecidual, favorecendo a recuperação da glândula mamária e a auto cura. Já Wellnitz et al. (2014) sete demonstraram que não houve diferença significativa na expressão de RNAm de citocinas entre os grupos tratado com 10 mg de prednisolona e o grupo não tratado. Resultados de estudos que investigaram o efeito dos glicocorticoides IM na produção leiteira são conflitantes. Sipka et al. (2013) não verificaram diferença significativa entre o grupo tratado com prednisolona e cefapirina e o tratado somente com cefapirina.

Resultados encontrados por Anderson e Hunt (1989), demonstraram que entre 24 e 48 h após a indução experimental de MC, a diminuição na produção de leite nas vacas tratadas com dexametasona foi significativamente maior quando comparada com as vacas tratadas com flunixinina meglumina e vacas do grupo controle. Além dos glicocorticoides, os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) são frequentemente recomendados na terapia de suporte da MC.

Estudos têm sido realizados sobre a eficácia desses fármacos (YEISER et al., 2012; FITZPATRICK et al., 2013), porém não há um consenso quanto a relevância desses resultados em casos de MC de ocorrência natural, pois semelhantemente aos estudos realizados com glicocorticoides, a maioria foi baseada em infecções experimentais. McDougall et al. (2016) em um ensaio

clínico incluindo 509 vacas em lactação de 61 rebanhos em seis países (Bélgica, França, Itália, Espanha, Holanda e Reino Unido), reportaram que a adição de 0,5 mg/Kg de Meloxicam por via subcutânea à terapia antimicrobiana IMM para o tratamento de casos de MC leves e moderados, resultou em uma maior proporção de cura bacteriológica (66%) do que o grupo placebo (50%). Vacas tratadas com Meloxicam tiveram 1,99 mais chances de cura bacteriológica do que o grupo placebo. Pelo conhecimento dos autores, esse foi o único estudo conduzido com casos de MC de ocorrência natural. Embora tenha sido utilizado AINE, os resultados são promissores e indicam a necessidade de estudos semelhantes com o uso de glicocorticoides.

No entanto, reforça-se a questão de que os estudos sobre os efeitos dos glicocorticoides encontrados e utilizados para essa revisão de literatura foram realizados em vacas infectadas experimentalmente com um único agente etiológico. Diferentemente das condições de campo, os tratamentos foram instituídos anteriormente ao aparecimento dos sinais clínicos, possibilitando maior probabilidade de prevenção de reações inflamatórias indesejáveis na glândula mamária. Assim, estudos são necessários para investigar a eficácia do tratamento com glicocorticoides em casos de MC de ocorrência natural.

CAPÍTULO 2 – Trabalho científico

Artigo a ser enviado para a revista *Livestock Science*

(Normas de publicação – ANEXO I)

Efficacy of a combination of cefoperazone and prednisolone for intramammary treatment of natural cases of bovine clinical mastitis: a randomized superiority trial.

Ananda F. R. Franco¹, Andre O. Andrade², Jose C. F. Pantoja*¹

¹ Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

² MilkPlan Dairy Consulting, Cruzilia, MG, Brazil.

* Corresponding author: jose.pantoja@unesp.br

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the efficacy of a commercially available combination of cefoperazone and prednisolone for intramammary treatment of natural cases of clinical mastitis (**CM**), as compared to a product that contained the same dose of cefoperazone. Mild and moderate CM cases from 14 herds were included in the study if met the eligibility criteria. Aseptic quarter milk samples were collected at case detection (**D0**), and at 14 (**D14**) and 21 (**D21**) days thereafter, for milk culturing and somatic cell counting. Quarters were randomized into **PCEF**: quarters received an intramammary infusion containing 250 mg of cefoperazone and 4 mg of prednisolone in an oily vehicle, at D0, and 48 hours thereafter; and **CEF**: quarters received an intramammary infusion containing 250 mg of cefoperazone in an oily vehicle, at D0 and 48 hours thereafter. The outcomes were microbiological cure, clinical cure, recurrence of CM, risk of new IMI at D14 and D21, SCC at D14 and D21, and cow-level milk production and SCC at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after CM. A total of 288 CM cases were randomized into PCEF (n = 147) or CEF (n = 141). Clinical cure (PCEF = 81.63% and CEF = 82.27%) and the median (1st - 3rd quartile) time to clinical cure [PCEF = 3.0 (2.5-4.0 days) and CEF = 3.50 (3.0-4.0) days] were not different between the treatments. The risk of clinical cure was 1.86 (95% CI: 1.38-2.51) times higher for mild cases, as compared with moderate cases. Microbiological cure (PCEF = 68.87% and CEF = 54.21%) was not different between the treatments. Cases associated with Gram-negative pathogens were 5.40 (95% CI: 1.84-15.91) times more likely to cure than those associated with Gram-positive pathogens. Recurrence of CM (PCEF = 26.67% and CEF = 21.93%) and the median time to recurrence (PCEF = 63.5 and CEF = 65 days) were not different between the treatments. For culture-negative quarters at D0, the incidence of new IMI at D14 (PCEF = 18.75% and CEF = 34.78%) and D21 (PCEF = 28.13% and CEF = 39.13%) were not different

between the treatments. Quarter milk SCC was numerically higher in CEF than in PCEF at D14 and D21, although the differences were not statistically significant. Likewise, no significant differences were found between cow-level SCC or milk production at the 1st, 2nd, and 3rd monthly DHI test after CM. The results of this study indicate that intramammary treatment of natural CM cases with PCEF was not superior to treatment with CEF, based on the risk of clinical and microbiological cure, CM recurrence, risk of new IMI, milk production, and SCC.

Key words: clinical mastitis, dairy cows, prednisolone, glucocorticoids, cefoperazone.

INTRODUCTION

Clinical mastitis (**CM**) is one of the most common diseases of dairy cattle. Results of studies worldwide indicate that 23-47% (Bradley et al., 2007; Petrovski et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Gao et al., 2017) of dairy cows experience CM within a year. Besides the economic losses resulting from milk discard, reduction in milk production, drugs, labor, and increased risk of death and removal from the herd (Rollin et al., 2015), treatment of CM is the most frequent reason for the use of antimicrobials in dairy herds (Nobrega et al., 2017; Redding et al., 2019).

In America, CM is mostly treated by intramammary administration of antimicrobials. Oliveira et al. (2011) reported that 66% of 562 cows that received CM treatment in Wisconsin dairies were treated only by the intramammary route, and 20% and 8% of the moderate and mild cases, respectively, received additional therapy including anti-inflammatory drugs. Parenteral administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (**NSAID**), in addition to antimicrobials, has been demonstrated to have beneficial effects, such as reduction of clinical signs and milk production losses (Shpigel et al., 1994), improvement of reproductive indexes (McDougal et al., 2016), and decreased risk of removal from the herd (McDougall et al., 2009; 2016).

As an alternative to NSAID, intramammary infusion of glucocorticoids associated with antimicrobials has been traditionally used to treat CM in some regions of the world, such as South America and Europe. Nonetheless, due to its potent anti-inflammatory and immunosuppressor effects, it is still unclear whether the use of glucocorticoids would result in improvement or worsening of relevant CM outcomes, such as clinical and microbiological cure, and risk of recurrence.

Results of experimental studies, in which mammary quarters were challenged with *Escherichia coli* (Sipka et al., 2013) or LPS (Wellnitz et al., 2014) to induce CM suggest

that intramammary infusion of prednisolone can contribute to improving clinical and microbiological cure. However, it is important to note that the treatments were initiated prior to the manifestation of clinical signs, as opposed to field conditions, in which cases are detected several hours after the onset of infection (Roberson, 2012), at a time characterized by a well established inflammatory response within the mammary gland (Sordillo, 2018).

Thus, the objective of this study was to assess the efficacy of a commercially available combination of cefoperazone and prednisolone for intramammary treatment of natural CM cases, as compared to a product that contained only cefoperazone. We tested the hypothesis that treatment with a combination of cefoperazone and prednisolone would be superior to treatment with cefoperazone alone, by increasing the risk of clinical and microbiological cure, decreasing the risk of recurrence, decreasing milk somatic cell count (SCC), and minimizing milk production losses.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by The Sao Paulo State University's Ethics Committee for Animal Use, protocol 0081/2018.

Experimental design

We conducted an unblinded, superiority, randomized controlled trial. The study was reported according to the REFLECT statement: Reporting guidelines for randomized control trials in livestock and food safety (Sargeant et al., 2010).

Eligibility criteria for farms and cows

A convenience sample of 14 herds located in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil, was used for the study. Eligible herds had to have at least 30 lactating Holsteins or Holstein cross-bred cows. Farms were eligible for inclusion regardless of adopting on-farm culturing to guide CM treatment decisions (Lago et al., 2011). For farms that adopted on-farm culturing, milk samples from all cases of CM were cultured in commercially available media for 18-24 hours at 36 C to direct treatment decisions. On these farms, culture-negative cases were not treated with antimicrobials and were, therefore, ineligible for inclusion.

Cows were eligible for inclusion if they had mild or moderate CM (Wenz et al., 2001) in one mammary quarter, if they had not been treated with antimicrobials or anti-inflammatories within 15 days before the onset of CM, and if had not shown visible signs of any disease other than mastitis at the time of inclusion.

Case definition

Clinical mastitis cases were identified by trained milking technicians at every milking, by inspecting the milk and the mammary gland. Cases were categorized into three severity scores, according to Wenz et al. (2001). Mild cases were defined when there were only milk abnormalities, such as changes in color, viscosity, and presence of flakes or pus. Moderate cases were defined when there were milk abnormalities and manifestation of clinical signs in the mammary gland, such as redness, swelling, and pain. Severe cases were defined when there were all previous abnormalities in addition to systemic signs of disease, such as fever, anorexia, prostration, and dehydration.

Sampling and data collection

Farms were initially visited to obtain experimental consent and to train milking technicians to perform collection of milk samples, severity scoring of CM, intramammary treatments, and filling of study forms. At detection of CM (**D0**) aseptic quarter milk samples (15 mL) from all cases that met the inclusion criteria were collected by farm personnel and frozen as soon as possible. The milking technicians inspected the affected quarter at every milking, until the 6th day after D0, to assess if the milk had returned to its normal aspect (clinical cure). Additional milk samples were collected at 14 (**D14**) and 21 (**D21**) days after D0 for milk culturing and SCC. Farms were visited biweekly, to supervise the activities and collect frozen samples, forms, and zootechnical data (such as parity, days in milk, and occurrence of subsequent cases of CM).

Randomization

Randomization was performed at the cow level. For each participating herd, a random numerical sequence was generated using PROC PLAN (SAS Institute, Cary, NC, USA). Each farm received a stack of envelopes previously randomized and labeled in an increasing sequence of numbers (Lago et al., 2011). The envelopes contained the experimental group to which the cow was allocated and a field form to record the case's information. Farm personnel were instructed to always respect the increasing order of the envelopes, i.e., for each new case they should have opened the first envelope of the stack.

Interventions

Included cows were allocated into one of the following groups: 1) **PCEF**: the affected quarter received an intramammary infusion containing 250 mg of cefoperazone and 4 mg of prednisolone in an oily vehicle, at D0, and 48 hours thereafter; 2) **CEF**:

quarters received an intramammary infusion containing 250 mg of cefoperazone in an oily vehicle, at D0 and 48 hours thereafter.

When on-farm culturing was adopted in a dairy, treatments were initiated approximately 24 hours after D0, upon completion of culture results. Otherwise, eligible cases were treated shortly after detection, at the end of the milking. Treatments were performed by trained milking technicians. The teat end was scrubbed with a cotton pad soaked with 70% alcohol, after which the product was infused within the teat cistern and the mammary gland was massaged upwards. The milk from treated animals was discarded for 84 hours after the last treatment, following the manufacturers' instructions.

Laboratory methods

Microbiological analyzes were performed at the Sao Paulo State University's Mastitis Research and Diagnostic Laboratory, according to the recommendations of the National Mastitis Council (NMC, 1999). In short, 10 μ L of milk were inoculated onto blood agar and McConkey plates and incubated for 72 hours at 36 C. An intramammary infection (**IMI**) was defined when there was pure growth of ≥ 1 colony on the plate (100 colony-forming units/mL) (Dohoo et al., 2011; Lago et al., 2011; Kabera et al., 2020). Samples were considered contaminated if there was growth of ≥ 3 different colonies on the plate. The identification of microorganisms was based on colony morphology, Gram staining and conventional biochemical tests (Markey et al., 2013). Somatic cell counting was performed with Somaticell (Idexx, Sao Paulo, SP, Brazil), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The outcome variables were: 1) microbiological cure (yes = 1 and no = 0): defined when both post-treatment milk samples (D14 and D21) were culture negative, or when there was isolation of a pathogen different than that isolated at D0; 2) clinical cure (days): disappearance of clinical signs, until the 6th day after D0. A failure to clinically cure was defined when there was no remission, or worsening of clinical signs (severe case), followed or not by additional use of any antimicrobial or anti-inflammatory drug; 3) recurrence of CM (days), defined when there was clinical cure followed by manifestation of clinical signs in the same quarter, until the 90th day after D0; 4) risk of new IMI at D14 and D21, defined as the presence of IMI at D14 and D21, for quarters that were culture negative at D0; 5) SCC: quarter milk SCC ($\log_{10}$ cells/mL) at D14 and D21; 6) cow-level SCC ($\log_{10}$ cells/mL): dairy herd improvement (**DHI**) SCC at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after CM; 7) cow-level milk production (kg/day): monthly DHI milk production at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after CM.

The explanatory variables considered in the analyses were: 1) CM severity (mild or moderate); 2) parity: 1, 2, or > 2 lactations; 3) pathogen type (Gram-positive or Gram-negative); 4) days in milk at D0: < 100, 100-199, $\geq$ 200 days, 5) group (CEF or PCEF), cow-level milk production at the DHI test prior to the case (kg/cow/day), and cow-level SCC ($\log_{10}$ cells/mL) at the DHIA test prior to the case.

Descriptive statistics were produced to characterize the farms and cows included in the study (Table 1). At the quarter level, Cox proportional hazard models (PROC PHREG; SAS Institute) were used to compare: 1) time to clinical cure; and 2) time to recurrence, as a function of the explanatory variables aforementioned. Bivariate analyses were performed to identify explanatory variables associated with each outcome and final multivariable models were constructed using a backwards variable selection procedure.

Two-way interactions between the explanatory variables were offered to the models and remained if significant. Farm was included in the models as a random effect, to consider the correlation among cows within the same herd.

For clinical cure, quarters were censored when there was a failure to cure by the 6th day after D0, or when the quarter was removed from the study (e.g., death or received additional treatment). For recurrence of CM, quarters were censored when there was no recurrence by the 90th day after D0, or when they were removed from the study. The proportional hazards assumption was analyzed by inspecting the log-log survival curves $[-\ln(-\ln S)]$, in which S is the survival function. For the group effect (PCEF or CEF), an interaction term between group and time was forced in the final model due to a violation of the proportional odds assumption. Thus, different hazard ratios were estimated for the periods 0-1.5 days (Time 1), and 2-6 days (Time 2) after D0.

At the quarter level, generalized linear models (logistic regression; PROC GLIMMIX; SAS Institute) were used to estimate the chances of microbiological cure and the chances of a new IMI at D14 and D21 as a function of the explanatory variables. Additionally, a repeated measures model (PROC MIXED; SAS Institute) was used to compare the average milk SCC (log₁₀ cells/mL) between the groups, at D14 and D21. Farm was included in the models as a random effect.

At the cow level, repeated measures models (PROC MIXED; SAS Institute) were used to compare the average DHI SCC (log₁₀ cells/mL) and milk production (kg/cow/day) between the groups, at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after D0. Statistical significance was declared for $P < 0.05$.

Sample size calculation

The sample size was calculated based on a superiority test, to demonstrate that the risk of clinical and microbiological cure would be higher in PCEF than in CEF. The calculations were performed assuming an α level of 0.05, statistical power of 0.8, and an expected 20% clinical or microbiological cure difference between the groups. Based on these assumptions, 91 quarters would be needed for each group. The sample size was increased by approximately 40% to account for culture-negative cases and missing data. The calculations were performed using PROC POWER (SAS Institute).

RESULTS

Herd characteristics

The study was conducted on 14 dairies in Sao Paulo and Minas Gerais states, Brazil, between August 2018 and July 2020. All farms had milking machines and cows were milked in pit parlors twice ($n = 7$) or three times per day ($n = 7$). Cows were housed in compost barns ($n = 9$), freestalls ($n = 2$), a combination of compost barns and freestalls ($n = 2$) or kept in semi-confinement systems ($n = 1$ farm). The median (1st - 3rd quartile) herd size was 125 (100 - 240) lactating cows, predominantly Holsteins, which produced 3,306.67 (2,380 - 5,950) kg of milk/herd/day, with bulk tank milk SCC of 414.03 (333.77 - 634.35) $\times 10^3$ cells/mL. Milk production was 25 (24.5 - 26.5) kg/cow/day.

Completeness of the dataset

During the study period, 288 cases of CM met the inclusion criteria and were randomized into PCEF ($n = 147$; 51.04%) or CEF ($n = 141$; 48.96%) (Table 1). The total number of observations and missing data for each outcome are presented in Figure 1.

Post-randomization group characteristics

Of the 288 included CM cases, 45.8% were from farms that adopted on-farm culturing to guide treatment decisions (Table 1). The distribution of CM severity was mild: 60.1%, and moderate: 39.9% (Table 1). Except for milk production prior to the case, there was no difference between the groups in the affected quarter's position, CM severity, percentage of cases from farms that adopted on-farm culturing, parity, and days in milk at D0 (Table 1). The distribution of pathogens isolated at D0, D14, and D21 is presented in Table 2.

Clinical cure

The percentage of quarters that experienced clinical cure was 81.63% and 82.27% for PCEF and CEF, respectively (Table 3 and Figure 2). Twenty-seven PCEF cases were censored: 12 cases were not clinically cured by the end of the follow-up period (6 days after D0), 11 cases required additional therapeutic interventions (antimicrobial, anti-inflammatory or both), 2 cases became severe, and 2 cases were not completely followed by farm personnel. Twenty-seven CEF cases were censored: 13 cases were not clinically cured by the end of the follow-up period, 9 cases required additional therapeutic interventions, 2 cases were not completely followed by farm personnel, and 3 cases were from cows that died during the follow-up period. The median time to clinical cure was 3.0 (2.5-4.0) and 3.50 (3.0-4.0) days for PCEF and CEF, respectively (Table 3 and Figure 2).

As a result of the bivariate and multivariate analyses, only CM severity was associated with clinical cure ($P < 0.01$; Table 4). The risk of clinical cure was 1.86 (95% CI: 1.38-2.51) times higher for mild cases, as compared with moderate cases.

Microbiological cure

The final dataset for microbiological cure included 106 PCEF and 107 CEF cases, due to exclusion of 41 and 34 cases, respectively, which were culture negative at D0 or there was failure to collect milk samples (Figure 1). The percentage of overall microbiological cure was 68.87% and 54.21% for PCEF and CEF, respectively (Table 3). As a result of the bivariate and multivariate analysis, only pathogen type was associated with the chances of microbiological cure (Table 4). Cases associated with Gram-negative pathogens were 5.40 (95% CI: 1.84-15.91) times more likely to cure than those associated with Gram-positive pathogens ($P = 0.001$).

Recurrence of clinical mastitis

The percent of recurrence and the median time to recurrence were 26.67% and 21.93%, and 63.5 and 65 days for PCEF and CEF, respectively (Table 3 and Figure 2). The risk of recurrence ($RR = 1.00$; 95% CI: 0.71-1.41; $P = 1.00$) was not different between PCEF and CEF.

Risk of new intramammary infection

For culture-negative quarters at D0, the incidence of new IMI at D14 was 18.75% (6/32) and 34.78% (8/23) for CEF and PCEF, respectively ($OR = 0.43$; 95% CI: 0.12-1.53; $P = 0.19$). At D21, the incidence of new IIM was 28.13% (9/32) and 39.13% (9/23) for PCEF and CEF, respectively ($OR = 0.61$; 95% CI: 0.19-1.95; $P = 0.40$).

Somatic cell count and milk production after clinical mastitis

At the quarter level, mean SCC was numerically higher in CEF than in PCEF at D14 ($P = 0.88$) and D21 ($P = 0.71$), although the differences were not statistically

significant (Figure 3). Likewise, no differences were found between cow-level DHI SCC or milk production at the 1st ($P = 0.99$), 2nd ($P = 0.99$), and 3rd ($P = 0.99$) monthly test after CM (Figure 4).

DISCUSSION

This trial was conducted to test the hypothesis that treating CM with a commercially available combination of cefoperazone and prednisolone would be superior to treating with cefoperazone alone. The prednisolone's mechanism of action may provoke different hypotheses regarding its efficacy for treating CM. It can be hypothesized that, when used by the intramammary route and combined with antimicrobials, administration of prednisolone would result in a higher probability of clinical cure, due to its potent anti-inflammatory effect. Nonetheless, it is unclear whether the improvement in clinical signs would be associated with a higher probability of microbiological cure, due to suppression of the immune response that is responsible for pathogen destruction (Wellnitz et al., 2014).

Results from experimental studies suggest some beneficial effects of intramammary treatment with prednisolone in quarters challenged with *Escherichia coli* (Sipka et al., 2013) or LPS (Wellnitz et al., 2014). Sipka et al. (2013) reported that intramammary treatment with 20 mg of prednisolone and 300 mg of cefapirin four hours after induction of *Escherichia coli* CM significantly reduced the CMT score in milk and the density of polymorphonuclear cells in the mammary tissue, as compared to treatment with cefapirin alone. In the same study, the milk concentration of *E. coli* seemed to decrease more rapidly in quarters treated with cefapirin and prednisolone, than in quarters treated with cefapirin alone, although differences were not statistically significant. Wellnitz et al. (2014) reported that an intramammary infusion of 10 mg of prednisolone

in quarters experimentally inoculated with LPS significantly decreased the milk concentration of serum albumin and lactate dehydrogenase, suggesting less disruption of the blood-milk barrier, although there was no effect on mRNA expression of TNF- α , IL-8, and IL-1 β in milk somatic cells.

It is important to note that, although the studies aforementioned provide some evidence that intramammary treatment of CM with prednisolone could improve clinical and microbiological cure (Sipka et al., 2013, 2014; Wellnitz et al., 2014), the results might not be extrapolated to natural CM cases, for which the manifestation of clinical signs, and consequent detection of the cases, occur several hours after the onset of infection (e.g., 12-24 hours for coliform pathogens; Roberson, 2012).

By studying natural cases, we observed biological trends suggesting quicker clinical cure, higher risk of microbiological cure, and lower post-case SCC in quarters treated with PCEF, than those treated with CEF. These biological trends were of small magnitude and not statistically significant but agree with the findings of the challenge studies. For all evaluated outcomes, the lack of significant differences between CEF and PCEF could be explained by different factors. Treatment of cases at a later stage (at detection or upon completion of on-farm culturing), when the inflammatory response is already well established within the mammary gland, would not allow a preventive anti-inflammatory effect, as opposed to the conditions set in challenge studies (Sipka et al., 2013, and Wellnitz et al., 2014). The PCEF dose of prednisolone (4 mg) was 2.5 to 5 times smaller than those used in previous studies (20 and 10 mg for Sipka et al., 2013, and Wellnitz et al., 2014, respectively). In addition, it is possible that there were differences in the products' formulations, such as the composition of the oily vehicles, that might have biased the estimation of an isolated prednisolone effect (please see study limitations).

Little research has been conducted with commercially available intramammary products that contain prednisolone for treating natural CM cases. Results of a field trial indicated no difference in the probability of clinical or microbiological cure between intramammary treatment with ceftiofur (125 mg), and a combination of tetracycline (200 mg), neomycin (250 mg), bacitracin (28 mg), and prednisolone (10 mg) (Cortinhas et al., 2016). Likewise, Tomazi et al. (2018) did not find differences in clinical or microbiological cure between treatments of natural CM cases with two commercially available intramammary products containing 10 or 20 mg of prednisolone. Although it is not possible to estimate an isolated prednisolone effect from these two studies, due to differences between antimicrobials, it was noticeable that the probability of clinical cure was not higher for quarters that received 10 mg (Cortinhas et al., 2016) or 20 mg of prednisolone (Tomazi et al., 2018), relative to treatments that did not include prednisolone and resulted in similar microbiological cure rates.

Altogether, the results of the present, and other studies, suggest that the intramammary use of prednisolone in combination with antimicrobials does not deteriorate udder health. Thus, if further studies including natural CM cases show a beneficial prednisolone effect on udder inflammation and animal welfare, its use could be justified.

For all study outcomes, the lack of difference between CEF and PCEF was independent of on-farm culturing, in which treatments were initiated approximately 24 hours after detection of the cases, upon confirmation of microbial growth on culture plates. In this situation, CM cases were treated at least 36 to 48 hours after the onset of infection. Even so, there was no interaction between group (or any other explanatory variable) and the use of on-farm culturing. In agreement with our findings, Lago et al. (2011) and Vasquez et al. (2017) reported that delaying antimicrobial treatment for 24

hours for CM cases subjected to on-farm culturing was not associated with a series of relevant outcomes, such as SCC, milk production, and risk of clinical or microbiological cure.

Study limitations

We chose to use CEF and PCEF because both were commercially available and, except for the prednisolone, they contained the same dose of cefoperazone sodium. As previously mentioned, possible differences in the products' formulations could bias the estimation of an isolated prednisolone effect. Factors such as the antimicrobial's particle size and vehicle composition can influence the drug's distribution and concentration in the mammary gland, the elimination rate and, therefore, the milk withdrawal time (Gehring & Smith, 2006). As both products contained vehicles that were based on vegetable oil (personal communication from the manufacturers' technical representatives), contained the same dose of cefoperazone, and had the same label directions for treatment regimen and milk withdrawal time, we believe these similarities minimized the introduction of bias when estimating an isolated prednisolone effect. Despite this limitation, we believe this study can be an initial step to understanding the efficacy of intramammary prednisolone for treating natural cases of CM.

From an animal welfare perspective, a limitation of this research was the lack of outcomes related to inflammation, such as quantification of pain and udder physical alterations during CM. Such variables were not studied due to the complexity of the measurements, since they would be performed by different milking crews (different shifts) and, probably, be subjected to an excessive degree of subjectivity and variability.

Unfortunately, we could not perform molecular or proteomic techniques to diagnose the isolated pathogens. As a result of phenotypic identification, there was a

higher probability of misdiagnosis, as compared with the techniques previously mentioned.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that intramammary treatment of natural CM cases with PCEF was not superior to treatment with CEF, based on the risk of clinical and microbiological cure, CM recurrence, risk of new IMI, milk production, and milk SCC.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the dairy farmers and staff who collaborated with this study. We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding this project (grant 405755/2016-3) and the scholarship (grant 0081/2018) of Ananda F. R. Franco.

REFERENCES

- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253-258.
- Cortinhas, C. S., Tomazi, T., Zoni, M. S. F., Moro, E., & Dos Santos, M. V. (2016). Randomized clinical trial comparing ceftiofur hydrochloride with a positive control protocol for intramammary treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of dairy science*, 99(7), 5619-5628.
- Dohoo, I. R., Smith, J., Andersen, S., Kelton, D. F., Godden, S., & Workers' Conference, M. R. (2011). Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 250-261.

- Gao, J., Barkema, H. W., Zhang, L., Liu, G., Deng, Z., Cai, L., ... & Han, B. (2017). Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4797-4806.
- Gehring, R., & Smith, G. W. (2006). An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 29(4), 237-241.
- Kabera, F., Dufour, S., Keefe, G., Cameron, M., & Roy, J. P. (2020). Evaluation of quarter-based selective dry cow therapy using Petrifilm on-farm milk culture: A randomized controlled trial. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7276-7287.
- Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., & Leslie, K. (2011). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of dairy science*, 94(9), 4441-4456.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. 2013. *Clinical veterinary microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- McDougall, S., Abbeloos, E., Piepers, S., Rao, A. S., Astiz, S., Van Werven, T., ... & Pérez-Villalobos, N. (2016). Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. *Journal of dairy science*, 99(3), 2026-2042.
- McDougall, S., Bryan, M. A., & Tiddy, R. M. (2009). Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4421-4431.
- National Mastitis Council. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. NMC, Verona, WI, USA.

- Nobrega, D. B., De Buck, J., Naqvi, S. A., Liu, G., Naushad, S., Saini, V., & Barkema, H. W. (2017). Comparison of treatment records and inventory of empty drug containers to quantify antimicrobial usage in dairy herds. *Journal of dairy science*, 100(12), 9736-9745.
- Oliveira, C. S. F., Hogeveen, H., Botelho, A. M., Maia, P. V., Coelho, S. G., & Haddad, J. P. A. (2015). Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), 297-305.
- Oliveira, L., Hulland, C., & Ruegg, P. L. (2013). Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of dairy science*, 96(12), 7538-7549.
- Petrovski, K. R., Heuer, C., Parkinson, T. J., & Williamson, N. B. (2009). The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 57(2), 109-115.
- Redding, L. E., Bender, J., & Baker, L. (2019). Quantification of antibiotic use on dairy farms in Pennsylvania. *Journal of dairy science*, 102(2), 1494-1507.
- Roberson, J. R. (2012). Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(2), 271-288.
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive veterinary medicine*, 122(3), 257-264.
- Sargeant, J. M., O'CONNOR, A. M., Gardner, I. A., Dickson, J. S., Torrence, M. E., Dohoo, I. R., ... & Snedeker, K. (2010). The REFLECT statement: reporting guidelines for randomized controlled trials in livestock and food safety: explanation and elaboration. *Journal of food protection*, 73(3), 579-603.

- Shpigel, N. Y., Chen, R., Winkler, M., Saran, A., Ziv, G., & Longo, F. (1994). Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 56(1), 62-68.
- Sipka, A., Gurjar, A., Klaessig, S., Duhamel, G. E., Skidmore, A., Swinkels, J., ... & Schukken, Y. (2013). Prednisolone and cefapirin act synergistically in resolving experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of dairy science*, 96(7), 4406-4418.
- Sordillo, L. M. (2018). Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *Journal of dairy science*, 101(6), 5629-5641.
- Tomazi, T., Lopes, T. A. F., Masson, V., Swinkels, J. M., & Santos, M. V. (2018). Randomized noninferiority field trial evaluating cephapirin sodium for treatment of nonsevere clinical mastitis. *Journal of dairy science*, 101(8), 7334-7347.
- Vasquez, A. K., Nydam, D. V., Foditsch, C., Wieland, M., Lynch, R., Eicker, S., & Virkler, P. D. (2018). Use of a culture-independent on-farm algorithm to guide the use of selective dry-cow antibiotic therapy. *Journal of dairy science*, 101(6), 5345-5361.
- Wellnitz, O., Wall, S. K., Saudenova, M., & Bruckmaier, R. M. (2014). Effect of intramammary administration of prednisolone on the blood-milk barrier during the immune response of the mammary gland to lipopolysaccharide. *American journal of veterinary research*, 75(6), 595-601.
- Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., Dinsmore, R. P., & Callan, R. J. (2001). Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(4), 567-572.

Table 1. Characteristics of clinical mastitis (CM) cases after random allocation into two experimental groups.

Variable	Group ¹		P-Value ²
	PCEF N (%)	CEF N (%)	
Quarters included in the study ³	147 (51.04)	141 (48.96)	0.74
RF	41 (27.89)	34 (24.11)	
LF	43 (29.25)	45 (31.99)	
RR	31 (21.09)	35 (24.82)	
LR	32 (21.77)	27 (19.15)	
CM severity ⁴			0.37
Mild	92 (62.59)	81 (57.45)	
Moderate	55 (37.41)	60 (42.55)	
Cases subjected to on-farm culturing ⁵			0.27
	72 (48.98)	60 (42.55)	
	Median (Q1-Q3) ⁶	Median (Q1-Q3)	
Parity	3.00 (1.00-4.00)	3.00 (2.00-4.00)	0.29
Days in milk at D0	177.00 (106.00-323.00)	208.00 (104.00-328.00)	0.35
Milk production prior to CM ⁷	29.00 (24.00-33.00)	30.00 (25.00-35.00)	0.02
SCC prior to CM ⁸	215.00 (58.00-756.00)	228.00 (73-876.00)	0.99

¹ PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

² P-values were derived from the Wilcoxon and Chi-square tests for continuous and categorical variables, respectively.

³ Right front (RF), left front (LF), right rear (RR), left rear (LR).

⁴ Severity of CM was scored into 1) mild: presence of visible abnormalities only in milk; 2) moderate: presence of visible abnormalities in milk and in the mammary gland.

⁵ Percentage of quarters subjected to on-farm culturing at detection of CM (D0). Only culture-positive cases were eligible for inclusion in the study. Quarters were treated 24 hours after D0, upon completion of diagnosis.

⁶ Median (1st quartile – 3rd quartile).

⁷ Milk production (kg/cow/day) at the monthly DHI (dairy herd improvement) test prior to CM.

⁸ SCC (x1000 log₁₀ cells/mL) at the monthly DHI test prior to CM.

Table 2. Distribution of microorganisms isolated from clinical mastitis cases, by group, at detection (D0), 14 (D14), and 21 (D21) days thereafter.

Culture result	Group ¹		Total N (%)
	PCEF N (%)	CEF N (%)	
D0			
<i>Bacillus</i> spp	2 (1.37)	0 (0.0)	2 (0.70)
Gram-negative rods ²	2 (1.37)	0 (0.0)	2 (0.70)
<i>Citrobacter freundii</i>	5 (3.42)	5 (3.60)	10 (3.51)
Contaminated	1 (0.68)	0 (0.0)	1 (0.35)
<i>Corynebacterium bovis</i>	6 (4.11)	9 (6.47)	15 (5.26)
<i>Escherichia coli</i>	11 (7.53)	14 (10.07)	25 (8.77)
<i>Enterobacter</i> spp	3 (2.05)	1 (0.72)	4 (1.40)
<i>Enterococcus</i> spp	10 (6.85)	12 (8.63)	22 (7.72)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (1.37)	3 (2.16)	5 (1.75)
Yeast	2 (1.37)	1 (0.72)	3 (1.05)
Mixed infection (2 pathogens)	2 (1.37)	6 (4.32)	8 (2.81)
Negative	34 (23.29)	25 (17.99)	59 (20.70)
<i>Pseudomonas</i> spp	0 (0.0)	1 (0.72)	1 (0.35)
Non-aureus staphylococci	21 (14.38)	30 (21.58)	51 (17.89)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (2.74)	1 (0.72)	5 (1.75)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	21 (14.38)	13 (9.35)	34 (11.93)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12 (8.22)	12 (8.63)	24 (8.42)
<i>Streptococcus</i> spp	2 (1.37)	2 (1.44)	4 (1.40)
<i>Streptococcus uberis</i>	6 (4.11)	4 (2.88)	10 (3.51)
Total	146	139	285
D14			
<i>Bacillus</i> spp	1 (0.72)	1 (0.77)	2 (0.74)
<i>Corynebacterium bovis</i>	8 (5.76)	4 (3.08)	12 (4.46)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0.0)	2 (1.54)	2 (0.74)
<i>Enterobacter</i> spp	2 (1.44)	0 (0.0)	2 (0.74)
<i>Enterococcus</i> spp	5 (3.60)	10 (7.69)	15 (5.58)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (0.72)	1 (0.77)	2 (0.74)
Yeast	1 (0.72)	1 (0.77)	2 (0.74)
Mixed infection (2 pathogens)	1 (0.72)	4 (3.08)	5 (1.86)
Negative	89 (64.03)	70 (53.85)	159 (59.11)
Non-aureus staphylococci	21 (15.11)	26 (20.00)	47 (17.47)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0.72)	0 (0.0)	1 (0.37)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3 (2.16)	5 (3.85)	8 (2.97)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 (3.60)	5 (3.85)	10 (3.73)
<i>Streptococcus uberis</i>	1 (0.72)	1 (0.77)	2 (0.74)
Total	139	130	269
D21			
<i>Bacillus</i> spp	2 (1.44)	0 (0.0)	2 (0.75)
<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0.0)	1 (0.78)	1 (0.37)
<i>Corynebacterium bovis</i>	7 (5.04)	6 (4.65)	13 (4.85)
<i>Enterobacter</i> spp	3 (2.16)	0 (0.0)	3 (1.12)

<i>Enterococcus</i> spp	4 (2.88)	8 (6.20)	12 (4.48)
Yeast	0 (0.0)	1 (0.78)	1 (0.37)
Mixed infection (2 pathogens)	4 (2.88)	3 (2.33)	7 (2.61)
Negative	89 (64.03)	74 (57.37)	163 (60.82)
Coagulase-negative staphylococci	19 (13.67)	26 (20.16)	45 (16.79)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (1.44)	0 (0.0)	2 (0.75)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3 (2.16)	5 (3.88)	8 (2.99)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 (3.60)	4 (3.10)	9 (3.36)
<i>Streptococcus uberis</i>	1 (0.72)	1 (0.78)	2 (0.75)
Total	139	129	268

¹ PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

² Non-identified Gram-negative rods.

Table 3. Descriptive statistics for udder health outcomes, by group.

Variable	Group ¹			
	PCEF		CEF	
	Total	N (%)	Total	N (%)
Clinical cure ²	147	120 (81.63)	141	116 (82.27)
Microbiological cure ³	106	73 (68.87)	107	58 (54.21)
CM recurrence ⁴	120	32 (26.67)	114	25 (21.93)
Risk of new IIM at D14 ⁵	32	6 (18.75)	23	8 (34.78)
Risk of new IMI at D21 ⁶	32	9 (28.13)	23	9 (39.13)
		Median (Q1-Q3)		Median (Q1-Q3)
Time to clinical cure (days)	120	3.00 (2.5-4)	116	3.50 (3-4)
Time to recurrence (days)	32	63.50 (31.5-79)	25	65.00 (37-77)
		Mean (Standard Error)		Mean (Standard Error)
SCC at D14 (log10 cells/mL)	137	5.22 (0.04)	129	5.26 (0.04)
SCC at D21 (log10 cells/mL)	138	5.19 (0.04)	129	5.25 (0.04)

¹ PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

² Disappearance of clinical signs until the 6th day after D0.

³ Defined when both post-treatment milk samples (D14 and D21) were culture negative, or there was isolation of a pathogen different than that isolated at D0.

⁴ Defined when there was clinical cure followed by manifestation of clinical signs until the 90th day after D0.

^{5,6} Presence of IMI at D14 or D21, for quarters that were culture negative at D0.

Table 4. Bivariate investigation of factors associated with time to clinical cure and risk of microbiological cure.

Variable	Clinical cure ¹			Microbiological cure ²		
	HR ³	95% CI ⁴	P-value	OR ³	95% CI	P-value
Group*time 1 ⁵			0.99			0.05
CEF	0.99	0.42-2.35		0.53	0.29-1.00	
PCEF	Referent			Referent		
Group*time 2	0.84	0.63-1.11	0.21	-	-	-
CEF				-	-	-
PCEF	Referent			-	-	-
Severity of CM ⁶			<0.01			0.21
Mild	1.86	1.38-2.51		0.67	0.35-1.30	
Moderate	Referent			Referent		
Parity			0.11			0.57
1	0.73	0.52-1.01		0.68	0.33-1.42	
2	1.04	0.76-1.42		0.90	0.44-1.85	
> 2	Referent			Referent		
Days in milk			0.78			0.11
<100	1.13	0.79-1.59		0.82	0.38-1.76	
100-200	1.03	0.75-1.42		1.99	0.94-4.24	
> 200	Referent			Referent		
On-farm culture ⁷			0.37			0.15
No	0.90	0.59-1.37		1.50	0.86-2.63	
Yes	Referent			Referent		
Pathogen type			0.72			<0.01
Gram-negative	0.94	0.63-1.38		5.40	1.84-15.91	
Gram-positive	Referent			Referent		
Milk production prior to CM ⁸	1.00	0.98-1.03	0.77	0.98	0.94-1.02	0.40
SCC prior to CM ⁹	1.13	0.85-1.50	0.39	0.81	0.51-1.29	0.38

¹ Disappearance of clinical signs until the 6th day after D0.

² Defined when both post-treatment milk samples (D14 and D21) were culture negative, or there was isolation of a pathogen different than that isolated at D0.

³ Hazard ratio (Cox proportional hazards models) or odds ratio (logistic regression models).

⁴ 95% confidence interval.

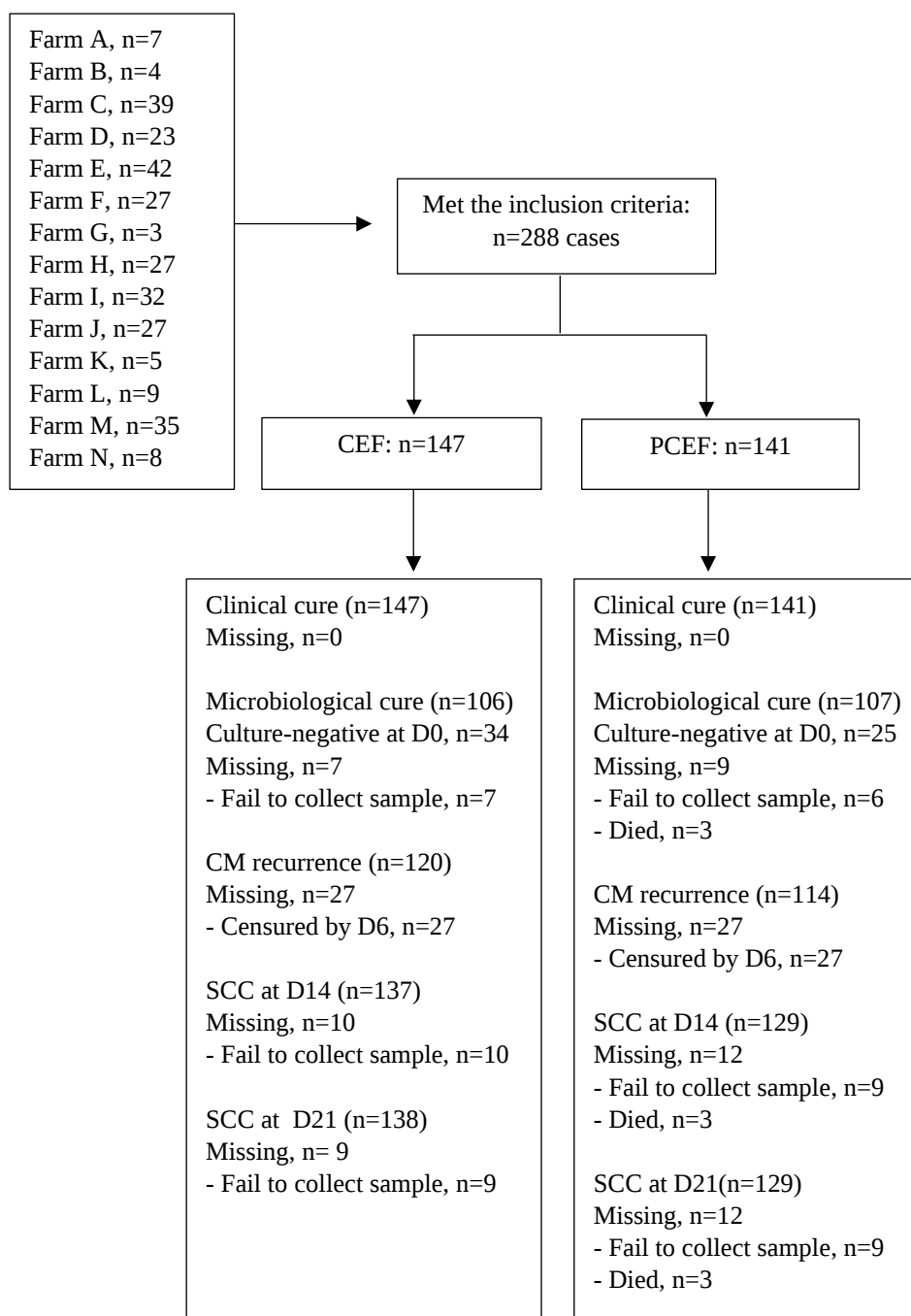
⁵ PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. Group*time represents the interaction between group and time, due to a violation of the proportional odds assumption. Time 1 = 0-1.5 days; Time 2 = 2-6 days after D0.

⁶ CM severity was scored into 1) mild: presence of visible abnormalities only in milk; 2) moderate: presence of visible abnormalities in milk and in the mammary gland.

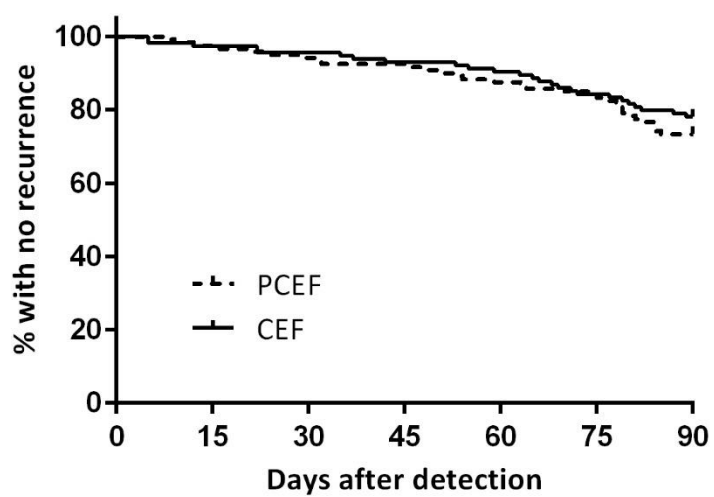
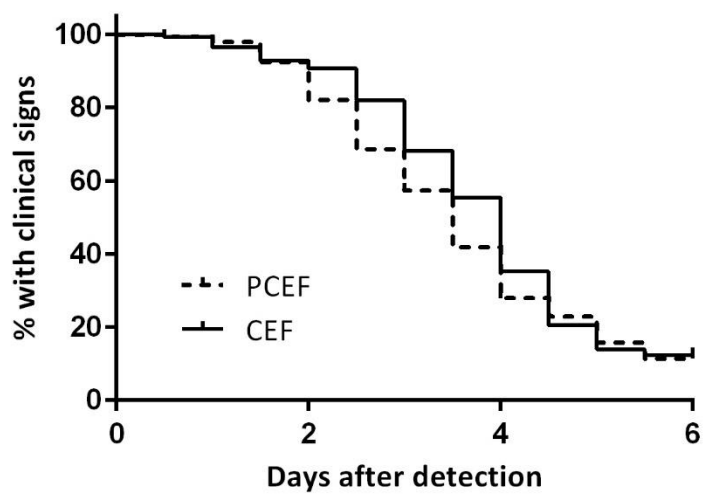
⁷ Only culture-positive cases were eligible for inclusion in the study.

⁸ Milk production (kg/cow/day) at the monthly DHI (dairy herd improvement) test prior to CM.

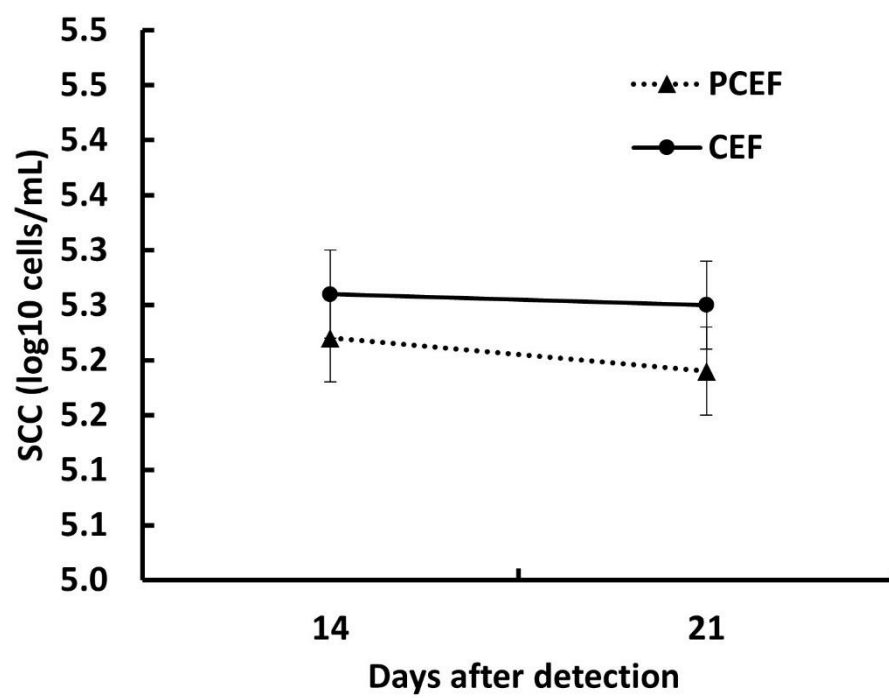
⁹ SCC ($\log_{10}$ cells/mL) at the monthly DHI test prior to CM.

Franco, Figure 1.

Franco, Figure 2.



Franco, Figure 3.



Franco, Figure 4.

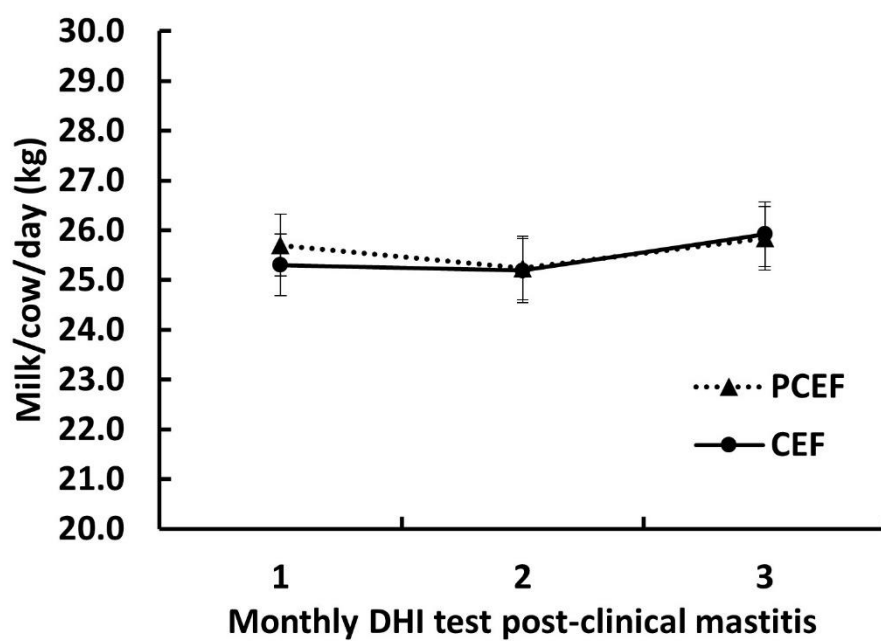
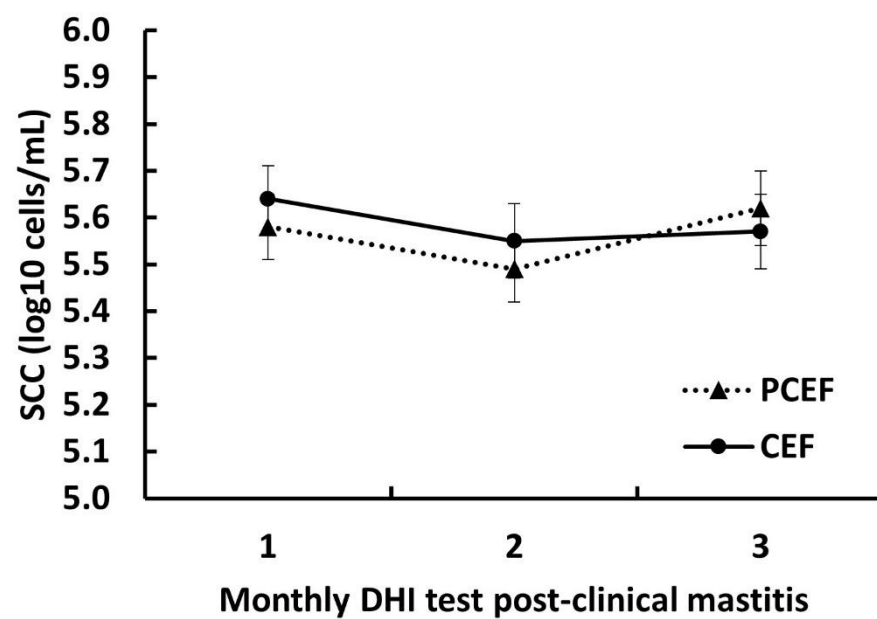


Figure 1. Flowchart of missing data and total number of observations used for the analysis of each study outcome. PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

Figure 2. Survival curves representing time to clinical cure (upper panel) and time to recurrence (lower panel), until the 6th (clinical cure) or the 90th day (recurrence) after detection of the case. PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

Figure 3. Least square means for quarter milk somatic cell count (log₁₀ cells/mL) between treatments, at 14 and 21 days after detection of the case. PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

Figure 4. Least square means for cow-level somatic cell count (log₁₀ cells/mL) or milk production (kg/cow/day) between treatments, at the 1st, 2nd, and 3rd monthly tests after detection of CM. PCEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) and prednisolone (4 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours

thereafter. CEF: quarters received an intramammary infusion of cefoperazone (250 mg) on the day of CM detection (D0), and 48 hours thereafter.

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da prednisolona associada à cefoperazona em casos naturais de MC. Errante et al., (2014) afirmou que os glicocorticoides são responsáveis pela regulação de inúmeros processos fisiológicos e supressão da resposta inflamatória e imune, sendo assim muito utilizados no controle da resposta inflamatória e processos alérgicos, reduzindo o infiltrado inflamatório, restaurando a integridade do epitélio.

No entanto, a grande maioria dos estudos que avaliaram a eficácia dos glicocorticoides realizaram indução experimental inoculando os microrganismos e causando infecção na glândula mamária para avaliação da cura clínica, microbiológica, contagem de células somáticas e alterações imunológicas (SIPKA, A., 2013, YEISER et al., 2012). Porém, todos avaliaram a eficácia dos glicocorticoides em relação ao processo inflamatório, não avaliando desfechos incluídos no presente estudo, tais quais a cura clínica, cura bacteriológica e recorrência em casos naturais de MC, refletindo condições reais de tratamento em nível de campo.

Sendo assim, a hipótese central deste estudo é que o uso da prednisolona associada à cefoperazona no tratamento intramamário de casos naturais de MC

em bovinos leiteiros poderia resultar em redução de tempo até a cura clínica e maiores taxas de cura bacteriológica quando comparado ao grupo tratado apenas com cefoperazona, além de resultar em menores taxas de recorrência de MC, menores perdas de produção leiteira e retorno mais rápido da CCS ao nível basal.

Nos estudos realizados por ANDERSON; HUNT, 1989; SIPKA et al., 2013; WELLNITZ et al., 2014, foi observado que a utilização dos glicocorticoides pode contribuir para a cura clínica e bacteriológica, além de diminuir os sinais clínicos da inflamação. No entanto, esses achados foram em condições experimentais, nas quais as infecções foram induzidas e o tratamento instituído antes do início dos sinais clínicos. Em condições de campo, considerando casos naturais de MC, a manifestação dos sinais clínicos pode ocorrer até aproximadamente 12 a 24 h após a infecção (ROBERSON, 2012), o que resultaria no tratamento em momento caracterizado por reação inflamatória já estabelecida na glândula mamária.

Em concordância com os resultados dos estudos experimentais supracitados, foram evidenciadas tendências biológicas indicando um efeito benéfico do tratamento PCEF (em relação ao CEF), caracterizadas por diminuição no tempo até a cura clínica, aumento das chances de cura microbiológica e menor CCS após o caso. No entanto, tais diferenças foram de pequena magnitude biológica e não acompanhadas de significância estatística. Dessa forma, esses resultados sugerem que o tratamento intramamário de casos naturais de MC com prednisolona não resulta em prejuízos à saúde da glândula mamária. Se estudos futuros demonstrarem que o uso da prednisolona resulta em diminuição do processo inflamatório e melhoria do bem-estar animal,

seu uso poderia ser justificado para o tratamento intramamário de casos naturais de MC.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento intramamário de casos naturais de MC com uma combinação de cefoperazona e prednisolona não foi superior ao tratamento apenas com cefoperazona, com base no risco de cura clínica ou microbiológica, risco de recorrência e novas IMI, produção de leite e CCS.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, K. L.; HUNT, E. Anti-inflammatory therapy in acute endotoxin-induced bovine mastitis. *Veterinary research communications*, v. 13, n.1, p. 17-26, 1989.

AITKEN, Stacey L.; CORL, Christine M.; SORDILLO, Lorraine M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011.

BARNOUIN, J.; BORD, S.; BAZIN, S.; CHASSAGNE, M. Dairy management practices associated with incidence rate of clinical mastitis in low somatic cell score herds in France. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 10, p. 3700–3709, 2005.

BARRAGRY, T. B. Beta-lactam antibiotics. *Veterinary Drug Therapy*. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. p. 221–240. 1994a.

BARRAGRY, T. B. Bovine mastitis. *Veterinary Drug Therapy*. Lea & Fabiger, Philadelphia, PA. p. 655–688. 1994b.

BYWATER, R., SILLEY, P., SIMJEE, S. Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements. *Vet. Microbiol.* 118, 158–159. 2006.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *Journal of dairy science*, v. 92, n. 5, p. 1941-1953, 2009.

CARDOSO, C. S.; HÖTZEL, M. J.; WEARY, D. M.; ROBBINS, J. A.; MARINA, A. G.; VON KEYSERLINGK, M. A. Imagining the ideal dairy farm. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 2, p. 1663–1671, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, third ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA (ISBN Number: 1-56238-659-X) CLSI Document M31-A3. 2008a.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline, third ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA (ISBN Number 1-56238-660-3) CLSI Document M 37-A3. 2008b.

DETILLEUX, J.; KASTELIC, J. P.; BARKEMA, H. W. Mediation analysis to estimate direct and indirect milk losses due to clinical mastitis in dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, v. 118, n. 4, p. 449-456, 2015.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J.; MASSART-LEEN, A.M.; BURVENICH, C. Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *Journal of dairy science*. v. 86, n. 3, p. 828–834, 2003.

ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. D. C. M.; ICIMOTO, M. Y.; FERRAZ, R. R. N.; CARICATI-NETO, A. Mecanismo de Ação e Resistência ao uso de glicocorticoides. *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica*, v.6, n. 2, 2014.

FOGSGAARD, K. K.; BENNEDSGAARD, T. W.; HERSKIN, M. S. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 3, p. 1730-1738, 2015.

FITZPATRICK, C. E.; CHAPINAL, N.; PETERSSON-WOLFE, C. S.; DEVRIES, T. J.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. *Journal of dairy science*, v. 96, n. 5, p. 2847-2856, 2013.

GIGUÈRE, Steeve; PRESCOTT, John F.; DOWLING, Patricia M. (Ed.). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley & Sons, 2013.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HEIKKILÄ, A. M.; NOUSIAINEN, J. I.; PYÖRÄLÄ, S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of dairy science*, v. 95, n. 1, p. 139-150, 2012.

HERTL, J. A.; SCHUKKEN, Y. H.; WELCOME, F. L.; TAUER, L. W.; GRÖHN, Y. T. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 3, p. 1465-1480, 2014.

HUIJPS, K.; LAM, T. J.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, v. 75, n. 1, p. 113-120, 2008.

LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.

LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*, p. 4-22, 2012.

LESLIE, K. E.; PETERSSON-WOLFE, C. S. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n. 2, p. 289-305, 2012.

LEVISON, L. J.; MILLER-CUSHON, E. K.; TUCKER, A. L.; BERGERON, R.; LESLIE, K. E.; BARKEMA, H. W.; DEVRIES, T. J. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 2, p. 1341-1350, 2016.

LOHUIS, J. A. C. M. et al. Effect of dexamethasone on experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *Journal of dairy science*, v. 71, n. 10, p. 2782-2789, 1988.

MARTINS, Thamires et al. Tratamento intramamário com gentamicina em vacas com mastite clínica e subclínica durante a lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 4, p. 283-289, 2016.

NOBREGA, Diego B. et al. Comparison of treatment records and inventory of empty drug containers to quantify antimicrobial usage in dairy herds. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 12, p. 9736-9745, 2017.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGVEEN, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, v. 121, n. 3, p. 297-305, 2015.

OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of dairy Science*. v. 97, n. 9, p. 5426–5436, 2014.

OLIVER, Stephen P.; MURINDA, Shelton E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012.

PETERS, M. D. P.; SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. *Animal*, v. 9, n. 12, p. 2024-2028, 2015.

PRESCOTT, John F. Beta-lactam antibiotics: cephalosporins. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, p. 139-157, 2013.

POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of dairy science*, v. 90, n.1, p. 249-261, 2007.

REDDING, Laurel E.; BENDER, Joseph; BAKER, Linda. Quantification of antibiotic use on dairy farms in Pennsylvania. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 2, p. 1494-1507, 2019.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 480, p. 247-258, 2000a.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n. 2, p. 271-88, 2012.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive veterinary medicine*, v. 122, n. 3, p. 257-264, 2015.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of mastitis in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 31, n. 1, p.17-46, 2015.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; LAM, T. J. G. M.; KEURENTJES, J.; VAN SCHAİK, G. An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. *Journal of dairy science*, v.98, n. 10, p. 6965-6977, 2015.

SCHUKKEN, Ynte H. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 144, n. 3-4, p. 270-289, 2011.

SCHUKKEN, Y. H.; ZURAKOWSKI, M. J.; RAUCH, B. J.; GROSS, B.; TIKOFSKY, L. L.; WELCOME, F. L. Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 96, n.10, p. 6763-6774, 2013.

SCHWAIGER, Julia et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 141-150, 2004.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, v. 34, n. 5, p. 475–491, 2003.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review Public Health*, v. 29, p. 151-169, 2008.

SIMJEE, S. et al. Potential confusion regarding the term 'resistance' in epidemiological surveys. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 61, n. 1, p. 228-229, 2008.

SIPKA, A.; GURJAR, A.; KLAESSIG, S.; DUHAMEL, G. E.; SKIDMORE, A.; SWINKELS, J.; COX, P.; SCHUKKEN, Y. Prednisolone and cefapirin act

synergistically in resolving experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of dairy science*, v. 96, n. 7, p. 4406-4418, 2013.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of dairy science*. v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

STEVENS, Marina; PIEPERS, Sofie; DE VLIEGHER, Sarne. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 4, p. 2896-2903, 2016.

TRUCHETTI, G.; BOUCHARD, É.; DESCÔTEAUX, L.; SCHOLL, D.; ROY, J. P. Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: A randomized clinical trial. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 78, n. 1, p. 31-37, 2014.

WELLNITZ, O.; WALL, S. K.; SAUDENOVA, M.; BRUCKMAIER, R. M. Effect of intramammary administration of prednisolone on the blood-milk barrier during the immune response of the mammary gland to lipopolysaccharide. *American journal of veterinary research*, v. 75, n. 6, p. 595-601, 2014.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; DINSMORE, R. P.; CALLAN, R. J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 218, n. 4, p. 567-572. 2001.

WILSON, C.D., Agger, N., Gilbert, G.A., Thomasson, C.A., Tolling, S.T. Field trials with cefoperazone in the treatment of bovine clinical mastitis. *The Veterinary Record*, v. 118, n. 1, p. 17-19, 1986.

WILSON, C. D.; GILBERT, G. A. Pharmacokinetics of cefoperazone in the cow by the intramammary route and its effect on mastitis pathogens in vitro. The Veterinary record, v. 118, n. 22, p. 607-609, 1986.

YEISER, E. E.; LESLIE, K. E.; MCGILLIARD, M. L.; PETERSSON-WOLFE, C. S. The effects of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis and flunixin meglumine administration on activity measures, feed intake, and milk parameters. Journal of dairy science, v. 95, n. 9, p. 4939-4949, 2012.

ANEXO I – Ficha clínica de acompanhamento dos casos de mastite clínica.



ENSAIO CLÍNICO: ASSOCIAÇÃO DE PREDNISOLONA E CEFOPERAZONA
NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO PARA MASTITE CLÍNICA



ANIMAL:	
---------	--

Grupo PREDCEFO: TRATAMENTO COM CEFAVET

QUARTO AFETADO:

() AD () AE () PD () PE

GRAU DE MASTITE:

() 1 - LEVE (apenas alteração no leite, como grumos, pus, sangue, coágulos ou coloração amarelada);

() 2 - MODERADA (alterações no leite e também no úbere, como dor à palpação, inchaço e vermelhidão);

ACOMPANHAMENTO DA CURA CLÍNICA:

1º DIA DE TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
PERÍODO: () MANHÃ () TARDE ____/____/____	() POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO
DIA 1 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO
2º DIA DE TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO

Contato: Ananda Finco (12)997537419; Prof. José Pantoja: (14)996216803

TRATAMENTO COM CEFAVET

DIA 3 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO
DIA 4 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO
DIA 5 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO

Retorno do leite ao tanque: ____/____/____

Observação: Não confiar na data prevista pela bula. Sempre levar análise de leite para saber se há resíduo do antibiótico.

Contato: Ananda Finco (12)997537419; Prof. José Pantoja: (14)996216803

ANIMAL:	
----------------	--

Grupo CEFO: TRATAMENTO COM UBERLAC
QUARTO AFETADO:

() AD () AE () PD () PE

GRAU DE MASTITE:

() 1 - LEVE (apenas alteração no leite, como grumos, pus, sangue, coágulos ou coloração amarelada);

() 2 - MODERADA (alterações no leite e também no úbere, como dor à palpação, inchaço e vermelhidão);

ACOMPANHAMENTO DA CURA CLÍNICA:

1º DIA DE TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
PERÍODO: () MANHÃ () TARDE ____/____/____	() POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO
DIA 1 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO
2º DIA DE TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO	() SEM GRUMO () POUCO GRUMO () MUITO GRUMO () INCHAÇO () VERMELHIDÃO

Contato: Ananda Finco (12)997537419; Prof. José Pantoja: (14)996216803

TRATAMENTO COM UBERLAC

DIA 3 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO
DIA 4 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO
DIA 5 PÓS TRATAMENTO:	SINTOMAS MANHÃ	SINTOMAS TARDE
____/____/____	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO	☐ SEM GRUMO ☐ POUCO GRUMO ☐ MUITO GRUMO ☐ INCHAÇO ☐ VERMELHIDÃO

Retorno do leite ao tanque: ____/____/____

Observação: Não confiar na data prevista pela bula. Sempre levar análise de leite para saber se há resíduo do antibiótico.

Contato: Ananda Finco (12)997537419; Prof. José Pantoja: (14)996216803

ANEXO II – Normas da publicação da revista Livestock Science



LIVESTOCK SCIENCE

An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1871-1413

DESCRIPTION

Livestock Science promotes the sound development of the **livestock sector** by publishing original, peer-reviewed research and review articles covering all aspects of the broad field of animal production. The journal welcomes submissions on the avant-garde areas of **animal genetics, breeding, growth, reproduction, nutrition, physiology, and behaviour** in addition to **genetic resources, welfare, ethics, health, management and production systems**. The high-quality content of this journal reflects the truly international nature of this broad area of research. Submissions focusing on diagnosis, disease treatments and epidemiology are not welcomed and works entirely based on either laboratory work or laboratory animals are only rarely considered.

AUDIENCE

Animal Scientists, Animal Breeders.

IMPACT FACTOR

2019: 1.700 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020