

Curta Comunicação: Susceptibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália.

P. Moroni,*¹ G. Pisoni,* M. Antonini,† R. Villa,‡ P. Boettcher,†² and S. Carli‡

*Department of Veterinary Pathology, Hygiene and Public Health, University of Milan, via Celoria 10, 20133 Milan, Italy

†Institute of Agricultural Biology and Biotechnology (IBBA), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Milan, Italy

‡Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety, University of Milan, via Celoria 10, 20133 Milan, Italy

RESUMO

A suscetibilidade antimicrobiana de 68 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de vacas infectadas por mastite subclínica durante o ano de 2004 foi examinada. Os agentes antimicrobianos testados foram os β-lactâmicos: penicilina G, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, amoxicilina + clavulanato, cefalonium e cefoperazona; e outras drogas incluindo lincomicina, oxitetraciclina, doxiciclina e kanamicina. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) registradas mostram que somente certas Penicilinas β-lactamase-resistente (especificamente cloxacilina) ou combinações com penicilina (amoxicilina + clavulanato) foram consistentemente eficazes contra *Staphylococcus aureus*, enquanto que os outros derivados de β-lactâmicos e drogas de outros grupos farmacêuticos foram ambos moderadamente eficazes ou ineficazes. Assim, penicilinas β-lactamase-resistente foram consideradas os agentes antimicrobianos de escolha para tratamento de mastites bovinas resultantes de infecção por *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chaves: *Staphylococcus aureus*, bovino, concentrações mínimas inibitórias.

A mastite bovina é a doença que causa maiores custos financeiros na cadeia leiteira em todo mundo, com perdas estimadas em 2 bilhões de dólares por ano somente nos EUA. Estas relevantes perdas econômicas são atribuídas ao leite rejeitado, redução na qualidade do leite, descartes precoces de vacas, custos com medicamentos, despesas com veterinários e aumento dos custos de trabalho. (Hoblet et al., 1991; Gruet et al., 2001). A doença é a razão mais freqüente para o uso de agentes antimicrobianos em fazendas leiteiras (Erskine, 2000). Infecções intramamárias (IIM) causadas por *Staphylococcus aureus* podem resultar em mastites clínicas ou subclínicas e são usualmente associada com a CCS aumentada. Tratamento apropriado das mastites durante a lactação ou o período seco é um

importante componente de qualquer programa de controle da mastite, mas os resultados dos tratamentos de mastites causadas por *Staph. aureus* é variável e a probabilidade de cura da doença não é alta, primariamente por causa da pobre distribuição da droga no úbere inflamado e a ocorrência de estafilococos resistentes ao agente antimicrobiano (Pyörälä and Pyörälä, 1994). Durante a lactação, a taxa de cura das mastites subclínicas varia uma enormidade, e essa variabilidade pode ser devido à escolha do agente antimicrobiano assim como a fatores associados com vacas infectadas e o quartos. Conseqüentemente, a cura não é provavelmente um evento aleatório. (Schukken et al., 1994). Terapia antimicrobiana é uma ferramenta primária para controlar mastites estafilocócicas, e os testes de susceptibilidade antimicrobiana podem guiar o veterinário a selecionar o mais apropriado agente antimicrobiano para tratamento de infecções intramamárias causadas por *Staph. aureus*. Entretanto, apesar de uma variedade de agentes antimicrobianos disponíveis, sucesso no tratamento de mastites por *Staph. aureus*, particularmente durante a lactação, ainda é muito baixo. De fato, o patógeno *Staph. aureus* tem muitas características que o faz difícil alvo para os agentes antimicrobianos. (Sol et al., 2000). Por exemplo, eles podem penetrar nas células fagocíticas e sobreviver dentro delas. Esse processo protege os patógenos de algumas das atividades dos agentes antimicrobianos, mesmo com drogas que podem penetrar nas células. O objetivo do presente estudo foi avaliar os testes padrões de resistência antimicrobiana em isolamentos de *Staph. aureus* coletados de IIM em vacas de 44 rebanhos comerciais na Itália.

Sessenta e oito isolamentos de *Staph. aureus* obtidos de quartos individuais de 68 vacas com mastite subclínica foram usados. Os isolamentos foram obtidos durante 2004, coletados de amostras de leite de animais pertencentes a 42 rebanhos leiteiros de diferentes regiões da Itália. Animais foram selecionados sob a base de ter CCS do leite maior que 400.000 cels/mL, mas sem sinais de mastite clínica. Rebanhos foram selecionados para representar diferentes prevalências de infecções intramamárias (IIM) por *Staph. aureus*, variando de 1 a 100%. O número de isolamentos para cada rebanho foi determinado de acordo com o número de animais em cada rebanho: um único isolamento foi coletado de 26 pequenos rebanhos (≤ 50 vacas em

Recebido em 17 de Outubro de 2005.

Aceito em 28 Fevereiro de 2006.

¹Correspondência para o Autor: paolo.moroni@unimi.it

²Endereço Atual: Animal Health and Production Section, Joint IAEA/FAO Division, International Atomic Energy Agency, A-1400 Vienna, Austria.

lactação), 2 isolamentos foram coletados de 11 rebanhos de tamanho médio (≤ 100 vacas em lactação) e mais que 2 isolamentos foram coletados de 5 grandes rebanhos (> 100 vacas em lactação). Todos os isolamentos foram identificados baseados na morfologia, teste-padrão de hemólise e tingimento de gram. Os cocos gram-positivos foram testados para catalase e produção de coagulase. As espécies foram identificadas por testes bioquímicos e por API Staph System (BioMérieux, Rome, Italy) e foram armazenados a -70°C em um caldo de cultura enriquecido com 15% de glicerol.

Nesse presente estudo, os antibióticos foram selecionados por serem aprovados e mais frequentemente usados para tratamentos de IIM de bovinos na Itália, mesmo se essas drogas não foram representativas de uma classe de antibióticos particular. Os agentes antimicrobianos selecionados e fornecidos pelos fabricantes como pó foram penicilina G (PEN), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), AMX + clavulanato, cloxacilina (CLX), cephalonium (CFL) e cefoperazona (CFP), kanamicina, oxitetraciclina, doxiciclina, e lincomicina (LIN). Os agentes antimicrobianos foram dissolvidos em solventes apropriados para fazer soluções em estoque e então, diluídos em água destilada estéril, de acordo com os métodos recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (2002). Os testes de concentração inibitória mínima foram executados de acordo com o método caldo de microdiluição, como recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (2002a), usando placas com fundo em formato "U" no total de 96. Diluições séricas em duas vezes dos agentes antimicrobianos foram preparadas a partir da solução em estoque de cada droga. O esquema de diluição diferiu de acordo com o agente antimicrobiano. Os inóculos foram preparados por diluição no caldo de cultura Mueller-Hinton pela noite (16 a 18 h) na solução salina protegida a uma densidade de 0.5 na escala de turbidez McFarland e finalmente diluído novamente 40 vezes antes do teste. O MIC foi definido como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano o qual o crescimento bacteriano foi completamente inibido. A cepa referência (*Staph. aureus*, ATCC 29213) foi inoculada como um controle em cada placa. Os dados de MIC foram sumarizados, calculando os valores de MIC para o qual os isolamentos foram iguais ou menores que 50 e 90% (MIC_{50} e MIC_{90} , respectivamente), assim como o mínimo e máximo valor de MIC (faixa de variação). Resistência e susceptibilidade, para a maioria dos agentes antimicrobianos testados, foi determinada de acordo com os limites do Clinical Laboratory Standards Institute (2002a) para patógenos veterinários. Os critérios interpretativos, entretanto, foram baseados nos dados de MIC e dados farmacocinéticos das drogas obtidos em humanos (retirados do Clinical Laboratory Standards Institute, 2002b). *Staphylococcus aureus* foram também testados para produção de β -lactamase pelo teste Nitrocefina (Cefinase, Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD). Numerosos dados estão disponíveis na literatura sobre susceptibilidade para agentes antimicrobianos de isolamentos de *Staph. aureus* coletados de IIM de rebanhos leiteiros. (Craven et al., 1986; Watts and Yancey, 1994;

Owens et al., 1997; Makovec and Ruegg, 2003; Pengov and Ceru, 2003; Tikofsky et al., 2003). Não obstante, obter continuamente atualização de valores de MIC é importante para prevenir o uso de drogas antimicrobianas ineficazes. Tabela 1 relata valores de MIC_{50} e MIC_{90} dos selecionados antibióticos contra isolamentos de *Staph. aureus* examinados no presente estudo. Todos os valores obtidos com a cepa do controle estavam dentro das variações previstas para todos os agentes antimicrobianos testados. Dos 68 isolamentos avaliados, nenhum foi susceptível a todos antibióticos e 64 (94%) foram resistentes a 3 ou mais agentes antimicrobianos. Nenhum isolamento foi resistente à CLX. Os β -lactâmicos (penicilinas and cefalosporinas) são largamente usados para tratamento intramamário de mastites dos bovinos, mas no presente experimento nós observamos uma atividade muito baixa de PEN ($\text{MIC}_{50} = 0.5$ e $\text{MIC}_{90} = 2,000 \mu\text{g/mL}$). O MIC_{90} para PEN relatada em estudos anteriores variou de <0.06 a $>100 \mu\text{g/mL}$ (De Oliveira et al., 2000; Erskine et al., 2004). No nosso estudo, 47 isolamentos (69%) de *Staph. aureus* foram resistentes a PEN. Essa proporção foi maior que aquela reportada por estudos comparáveis na Argentina (40%; Gentilini et al., 2000), nos EUA (38.4 to 60.9%; Erskine et al., 2002), e Finlândia (50%; Mylly et al., 1998), mas foi menor que aqueles relatados em cepas isoladas de parênquimas mamários de vacas leiteiras abatidas no Brasil (75%; Costa et al., 2000). Similarmente, no grupo de penicilinas, AMP e AMX tiveram atividade in vitro muito pobre ($\text{MIC}_{50} = 2$ e $4 \mu\text{g/mL}$, e $\text{MIC}_{90} = 500$ e $1,000 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), e 100 e 98.5% dos isolamentos foram resistentes para esses respectivos agentes antimicrobianos. Resultados de outros estudos para MIC_{90} para AMP diferiram notavelmente de nossos achados; Eles variaram de, somente, 0.5 to $4 \mu\text{g/mL}$ (Watts and Salmon, 1997; De Oliveira et al., 2000). Esses altos níveis de resistência foram provavelmente relatados pela presença de fortes produtores de β -lactamase entre os isolamentos estafilocócicos testados. Os dados in vitro confirmaram a influência da produção de β -lactamase sobre a susceptibilidade microbiana para β -lactâmicos em geral e para PEN em particular. De fato, a diferença entre os valores de MIC_{50} e MIC_{90} , com referência a PEN, AMP, e AMX, correlata muito bem com a identificação de 28 isolamentos produtoras de β -lactamase (58%). Recálculo do MIC_{90} sem essas cepas renderam valores de $0.5 \mu\text{g/mL}$ for PEN e $4 \mu\text{g/mL}$ para AMP e AMX. De outro lado, os β -lactamase-resistentes CLX e amoxicilina + clavulanato (um inibidor de β -lactamase amplamente utilizado) foram ambos altamente eficazes, com MIC_{50} de 0.25 e 1 a $0.5 \mu\text{g/mL}$ e MIC_{90} de 0.5 e 8 a $4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As cefalosporinas são usualmente classificadas em 3 diferentes gerações baseadas em seus respectivos espectro antimicrobiano. No presente estudo, CFL e CFP foram incluídos como primeira geração (de boa a excelente atividade contra bactérias gram-positivas, mas atividade gram-negativa dependente de cepa) e droga de terceira geração (de boa a moderada atividade contra bactérias gram-positiva e de boa a excelente atividade contra gram-negativa), respectivamente. Cefoperazone e CFL mostraram atividade antiestafilocócica maior que aquelas

CURTA COMUNICAÇÃO: SUSCEPTIBILIDADE À DROGAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Tabela 1. Susceptibilidade Antimicrobiana de 68 isolamentos de *Staphylococcus aureus*, coletados de diferentes animais durante toda a lactação¹

Agente	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Faixa de Variação (µg/mL)	Limite para Sensibilidade (µg/mL)	Resistência (%)
PEN	0,5	2.000	0,007 > 2.000	≥ 0,25	69,1
AMP	2	500	0,25 > 1.000	≥ 0,5	98,5
AMX	4	1.000	0,25 > 1.000	≥ 0,5	100
AMC	1/0,5 ²	8/4 ³	0,06/0,03 a 16/8	≥ 8/4	20,6
CLX	0,25	0,5	0,06 a 2	≥ 4	0
KAN	8	64	2 a 250	≥ 64	16,2
OXT	32	500	1 > 500	≥ 16	58,8
DOX	8	250	0,5 a 250	≥ 16	47,1
CFP	2	16	0,5 a > 250	NA	—
CFL	0,12	2	0,06 a 15,6	NA	—
LIN	4	250	1 > 500	NA	—

¹MIC₅₀ e MIC₉₀ são as concentrações mínimas de vários agentes antimicrobianos necessários para inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolamentos, respectivamente. PEN = benzilpenicilina; AMP = ampicilina; AMX = amoxicilina; AMC = AMX + clavulanato; CLX = cloxacilina; KAN = kanamicina; OXT = oxitetraciclina; DOX = doxiciclina; CFP = cefoperazona; CFL = cefalonium; e LIN = lincomicina; NA = não avaliado.

² Critério de interpretação baseado em dados humanos.

³ Concentração amoxicillin/clavulanate.

penicilinas sensíveis à β-lactamase. Entre essas 2 drogas, CFL mostrou maior eficácia que CFP (MIC₅₀ = 0.12 vs. 2 µg/mL e MIC₉₀ = 2 vs. 16 µg/mL, respectivamente). Esses resultados podem indicar que esses agentes são resistentes à β-lactamase, o qual hidrolisa as penicilinas. Lincomicina, oxitetraciclina, doxiciclina e kanamicina (selecionadas como drogas representantes dos grupos lincosamida, tetraciclina e aminoglicosídeos, respectivamente) tiveram moderado a pobre atividade contra isolamentos de *Staph. aureus* testados nesse presente estudo, como demonstrado pela variação dos valores de MIC de 1 a >500, 1 a >500, 0.5 a 250, 2 a 250 µg/mL, respectivamente.

Os agentes antimicrobianos lincosamida (LIN and clindamicina) agem por inibir a síntese protéica bacteriana RNA-dependente (Yao and Moellering, 1995). Lincomicina mostrou um MIC₉₀ of 250 µg/mL e esse valor foi maior que aqueles previamente encontrados em outros países. Por exemplo, LIN MIC₉₀ variou de 16.0 a 64 µg/mL para isolamentos nos EUA, Irlanda, Islândia e Alemanha, e de 1.0 a 8.0 µg/mL para isolamentos na Dinamarca, Inglaterra, Noruega, Suécia e Finlândia (De Oliveira et al., 2000). O valor LIN MIC₉₀ obtido para as cepas testadas nesse estudo pode estar ligado com o fato de carregarem o gene erm, o qual codifica resistência aos agentes antimicrobianos lincosamidas, macrolídeos e estreptogramina B (Leclercq and Courvalin, 1991). Tetraciclina e aminoglicosídeos são antibióticos de amplo espectro amplamente usados para tratar doenças respiratórias e outras doenças bovinas. Por causa desse uso difundido, resistência à tetraciclina e aminoglicosídeo, mostrado por uma ampla variedade de determinantes, foi demonstrado pelo alto MIC₉₀ observado no presente estudo.

Muitos outros fatores além do uso de antimicrobianos podem influenciar todo o padrão de susceptibilidade dos patógenos de mastites. Tecido fibroso no úbere dos animais

cronicamente infectados por *Staph. aureus* frequentemente evita a penetração dos agentes antimicrobianos (De Oliveira et al., 2000). Entretanto, a recomendação geral é para descartar todos os animais com IIM crônica por *Staph. aureus*. O controle das IIM acometidas por *Staph. aureus* deve envolver as melhores práticas de manejo e seleção dos antimicrobianos usados. Infelizmente, a maioria dos agentes antimicrobianos usados na medicina veterinária ainda confia nos critérios interpretativos desenvolvidos por Homens e a validação desses critérios interpretativos em categorizar os patógenos veterinários como susceptível ou resistente não é estabelecido (Watts and Yancey, 1994). Atualmente, somente pirlimicina e uma combinação de penicilina e novobiocina tem desenvolvido critérios interpretativos usando dados de MIC gerados com patógenos de mastites. Interpretação de dados de susceptibilidade antimicrobiana para os compostos restantes confia nos critérios interpretativos desenvolvidos com dados humanos. Os critérios interpretativos para categorizar isolamentos como susceptível ou resistente são baseados em dados humanos para a maioria das drogas testadas nesse estudo. Assim, a utilidade dos dados de susceptibilidade é limitada a monitorar a porcentagem de *Staph. aureus* com MIC acima de um valor inicial e esses valores podem não ser usados para prever eficácia clínica. A porcentagem de dados de resistência nesse estudo foi usada com propósitos comparativos, mas não como um indicador de real nível de resistência. Os testes experimentais executados mostraram importante atividade *in vitro* contra os isolamentos de *Staph. Aureus* na maioria dos agentes antimicrobianos atualmente usados na Itália para controlar as IIM. Entretanto, nós consideramos isso necessário para desenvolver novos critérios interpretativos para estudar patógenos específicos da mastite e para prever eficácia clínica em todas aquelas situações no qual, como nos casos de mastite causada por *Staph. aureus*, barreiras em tecidos fibrosados ou outros fatores patológicos ou fisiológicos, podem reduzir a eficácia *in vivo* das drogas.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos R. Zadoks e L. Tikofsky pela revisão técnica do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard. 2nd ed. Document M31-A. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002b. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 12th Informational Supplement. Documents M2–A7 and M7–A5. CLSI, Wayne, PA.
- Costa, E. O., N. R. Benites, J. L. Guerra, and P. A. Melville. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 47:99–103.
- Craven, N., J. C. Anderson, and T. O. Jones. 1986. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Rec.* 118:290–291.
- De Oliveira, A. P., J. L. Watts, S. A. Salmon, and F. M. Aarestrup. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83:855–862.
- Erskine, R. 2000. Antimicrobial drug use in bovine mastitis. Pages 712–734 in *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. J. F. Prescott, J. D. Baggot, and R. D. Walker, ed. Iowa State University Press, Ames.
- Erskine, R., J. Cullor, M. Schaellibaum, P. Yancey, and A. Zecconi. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. Page 400–414 in *Proc. 43rd National Mastitis Council Mtg. National Mastitis Council, Verona, WI*.
- Erskine, R. J., R. D. Walker, C. A. Bolin, P. C. Bartlett, and D. G. White. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85:1111–1118.
- Gentilini, E., G. Denamiel, P. Llorente, S. Godaly, M. Rebuelto, and O. De Gregorio. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83:1224–1227.
- Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot, and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50:245–259.
- Hoblet, K. H., G. D. Schnitkey, D. Arbaugh, J. S. Hogan, K. L. Smith, P. S. Schoenberg, D. A. Todhunter, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and H. R. Conrad. 1991. Cost associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199:190–196.
- Leclercq, R., and P. Courvalin. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antimicrobial agents by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1267–1272.
- Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8905 samples (1994–2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:1582–1589.
- Myllys, V., K. Asplund, E. Brofeldt, V. Hirvela-Koski, T. Honkanen-Buzalski, J. Junttila, L. Kulkas, O. Myllykangas, M. Niskanen, H. Saloniemi, M. Sandholm, and T. Saranpaa. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995: Changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 39:119–126.
- Owens, W. L., C. H. Ray, J. L. Watts, and R. J. Yancey. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 80:313–317.
- Pengov, A., and S. Ceru. 2003. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 86:3157–3163.
- Pyörrälä, S. H. K., and E. O. Pyörrälä. 1994. Efficacy of bovine mastitis therapy during lactation. *Proc. XVII Nordic Veterinary Congr., Reykjavik, Iceland. The Icelandic Veterinary Association, Reykjavik*.
- Schukken, Y. H., B. A. Mallard, J. C. Dekkers, K. E. Leslie, and M. J. Stear. 1994. Genetic impact on the risk of intramammary infections following *Staphylococcus aureus* challenge. *J. Dairy Sci.* 77:639–647.
- Sol, J., O. C. Sampimon, H. W. Barkema, and Y. H. Schukken. 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83:278–284.
- Tikofsky, L. L., J. W. Barlow, C. Santisteban, and Y. H. Schukken. 2003. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb. Drug Resist.* 9(Suppl. 1):S39–S45.
- Watts, J. L., and R. L. Yancey. 1994. Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification system and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:346–356.
- Watts, J. L., and S. A. Salmon. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -lactamase. *J. Dairy Sci.* 80:788–791.
- Yao, J. D. C., and R. C. Moellering, Jr. 1995. Antibacterial agents. Pages 1281–1307 in *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover, ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC. *Journal of Dairy Science* Vol. 89 No. 8, 2006