

Universidade Federal de Juiz de Fora

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

NAIARA APARECIDA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* na região da Zona da Mata de Minas Gerais

Juiz de Fora

2018

NAIARA APARECIDA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* na região da Zona da Mata de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do leite e derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Silva

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Naiara Aparecida Rodrigues de .

Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* na região da Zona da Mata de Minas Gerais / Naiara Aparecida Rodrigues de Oliveira. -- 2018.

70 p. : il.

Orientador: Guilherme Nunes de Souza Souza

Coorientador: Marcio Roberto da Silva Silva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2018.

1. Mastite Bovina. 2. Epidemiologia. 3. Contagem de Células Somáticas. I. Souza, Guilherme Nunes de Souza, orient. II. Silva, Marcio Roberto da Silva, coorient. III. Título.

Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* na região da Zona da Mata de Minas Gerais

NAIARA APARECIDA RODRIGUES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Dr. Guilherme Nunes de Souza

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 28/02/2018.

Dra. Maria Aparecida V. P. Brito

Dra. Carla Christine Lange

Dr. Marcio Roberto Silva

Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza
Orientador

Juiz de Fora

2018

Dedico esse trabalho a Deus e a minha família, sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tantas bênçãos derramadas em minha vida e por me conduzir a mais esta vitória.

Agradeço imensamente à minha família. A minha mãe Veronica Rodrigues do Carmo que sempre me apoiou. Ao meu pai Murilo Rezende de Oliveira, que mesmo não estando entre nós sei que lá do céu olha por mim. Aos meus irmãos Hudson Rodrigues de Oliveira e Robson Rodrigues de Oliveira por sempre acreditarem em mim. Aos meus sobrinhos Murilo Vieira Rezende de Oliveira, Julia Bueno de Oliveira e Luisa Bueno de Oliveira que são tão importantes em minha vida. Ao meu esposo Ronaldo Bruno dos Santos pela paciência e companheirismo e por estar sempre ao meu lado e ao meu amado filho ainda em meu ventre Ronaldo Bruno de Oliveira, que será uma benção em minha vida.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, à Embrapa Gado de Leite e ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro a este trabalho (Projeto APQ CVZ 01637/14).

Agradeço ao meu orientador, Dr. Guilherme Nunes de Souza, por nunca desistir de mim e acreditar que eu era capaz. Obrigada pela oportunidade da condução deste trabalho.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Marcio Roberto Silva, por me auxiliar sempre que foi necessário e pelas ótimas aulas de estatística.

Agradeço a Juliana França Monteiro de Mendonça que realizou as análises microbiológicas deste trabalho sob orientação da Dra Maria Aparecida V. P. Brito, Dra Carla Christine Lange e Marcos Aurélio Souto e Silva, e também me auxiliou em muitas outras coisas, meu sincero muito obrigada por tudo.

Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite: Dra Maria Aparecida V. P. Brito, Dra Carla Christine

Lange, Marcos Aurélio S. Silva e Isabela Fagundes Evangelista que muito contribuíram nas análises microbiológicas deste trabalho.

Agradeço a Cooperativa dos Produtores de Leopoldina pela liberação para que eu pudesse realizar este trabalho, e aos colegas Adriano Arruda e Antônio Marcos Jacinto pelo grande auxílio na coleta das amostras.

"Felizes são os que ouvem a palavra do Senhor e a guardam"

Lucas 11:28

RESUMO

A mastite está entre as doenças do gado leiteiro que mais causam prejuízos em todo mundo. Entre os agentes causadores estão os patógenos de origem contagiosa *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* que mais contribuem para o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) em rebanhos infectados. Desde a implantação da Instrução Normativa 51 (IN 51/2002) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento(MAPA) em 2005, pouco se avançou em melhorias no parâmetro CCS dos rebanhos brasileiros, fazendo-se necessário o levantamento da situação das regiões a fim de traçar estratégias específicas para o controle da mastite e atendimento aos requisitos da legislação. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma classificação baseada em risco (dados probabilísticos) (risco) para presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* em rebanhos bovinos leiteiros localizados Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e vinculados a uma cooperativa. O trabalho foi realizado utilizando a população de bovinos leiteiros vinculados à Cooperativa dos Produtores de Leite de Leopoldina de Responsabilidade Ltda (LAC). A avaliação da dependência espacial entre as coordenadas geográficas dos rebanhos e a média geométrica anual da contagem de células somáticas foi realizada por meio de semivariogramas e os mapas de isolinhas por meio do método de Krigagem. Amostras para análise de CCS foram coletadas mensalmente. Para o estudo de prevalência foram selecionados aleatoriamente 43 rebanhos dos quais foram coletadas 3 amostras consecutivas de cada rebanho para análises microbiológicas durante o período de junho de 2016 a novembro de 2017. A análise espacial apresentou grau de dependência espacial e coeficiente de determinação fracos ($GD < 0,25$; $r^2 < 0,13$). A distribuição de frequência da CCS mostrou que apenas 23,3% dos rebanhos atendem ao limite de 400.000 células/mL . A prevalência de *S. aureus* foi de 93% a de *S. agalactiae* de 81,4% não diferindo estatisticamente entre si. Dos 43 rebanhos analisados, em tres (7%) não houve isolamento de *S. aureus* e de *S. agalactiae*, cinco (11,6%) apresentaram isolamento somente de *S. aureus* e 35 (81%) apresentaram isolamento de ambos patógenos. Não houve rebanhos com isolamento somente de *S. agalactiae*. Dos rebanhos sem isolamento destes agentes, a média de CCS foi de 224.000 células/mL, com isolamento somente de *S. aureus* a média de CCS foi de 447.000

células/mL, e para rebanhos com isolamento dos dois patógenos, *S. aureus* e *S. agalactiae*, 794.000 células/mL. Os rebanhos sem isolamento ou somente com isolamento de *S. aureus* estão associados a CCS inferior a 400.000 células/mL e rebanhos com isolamento de ambos os patógenos estão associados a CCS superior a 400.000 células/mL. A utilização da curva ROC para dados de CCS de rebanhos associados ao estudo de prevalência de *S. aureus* e de *S. agalactiae* permitiu classificar rebanhos em três níveis de risco: baixo, médio e alto. A prevalência de *S. aureus* e de *S. agalactiae* entre rebanhos foi considerada alta para ambos os patógenos, indicando que as medidas de controle para estes patógenos não estão sendo realizadas de maneira eficiente. Não foi observada diferença entre as prevalências de *S. aureus* e de *S. agalactiae* entre os rebanhos. Foi observada uma associação entre a CCS dos rebanhos e a presença de ambos os patógenos, permitindo desta forma uma classificação dos rebanhos.

Palavras chave: Mastite bovina. Epidemiologia. Contagem de Células Somáticas.

ABSTRACT

Mastitis is among the most damaging diseases in dairy cattle worldwide. Among the causative agents are the pathogens of contagious origin *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* that contribute most to the increase of Somatic Cell Count (SCC) in infected herds. Since the implantation of IN 51 in 2005, little progress was made in improving the SCC in the Brazilian dairy herds, therefore it is necessary to survey the mastitis situation of the regions in order to devise specific control strategies for mastitis control and compliance with the legislation requirements. The objective of the present study was to establish a risk - based classification (risk) for the presence of *S. aureus* and *S. agalactiae* in dairy herds located in the Zona da Mata of the State of Minas Gerais associated to a cooperative. The work was carried out using the population of dairy herds of Cooperativa dos Produtores de Leite de Leopoldina de Responsabilidade Ltda. (LAC). The evaluation of the spatial dependence between the geographical coordinates of the herds and the annual geometric mean of the somatic cell count was performed using semi-variograms and isoline maps using the Kriging method. Milk samples for SCC analyses were collected monthly. For the prevalence study, 43 herds were randomly selected and three milk samples from each herd were collected for microbiological analyzes during the period of June 2016 to November 2017. The spatial analysis presented degree of spatial dependence and weak determination coefficient (GD <0.25; r^2 <0.13) The frequency distribution of CCS showed that only 23.3% of the herds met the limit of 400,000 cells / mL. The prevalence of *S. aureus* (93%) and of *S. agalactiae* (81.4%) did not differ statistically from one another. Of the 43 herds analyzed, three (7%) was no isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae*, five (11.6%) had isolation only of *S. aureus* and 35 (81%) presented isolation of both pathogens. There were no herds with isolation of *S. agalactiae*. The mean SCC was 224,000 cels / mL, for the herds with absence of *S. aureus* and *S. agalactiae*, and 794.000 cels/ mL when the this two pathogens were present. The mean SCC for the herds with isolation only of *S. aureus* was 447,000 cells / mL,. The absence or isolation only *S. aureus* herds are associated with CCS less than 400,000 cells / mL and herds with isolation of both pathogens associated with CCS greater than 400,000 cells / mL. The use of the ROC curve for herd CCS data associated to the study of *S. aureus* and *S. agalactiae*

prevalence allowed the classification of the herds at three levels of risk: low, medium and high. The prevalence of *S. aureus* and *S. agalactiae* among herds was considered high for both pathogens, indicating that the control measures for these pathogens are not being carried out efficiently. There was no difference between the prevalences of *S. aureus* and *S. agalactiae* among the herds. An association was observed between the SCC of the herds and the presence of both pathogens, thus allowing a classification of the herds.

Keywords: Mastitis bovine .Epidemiology. Somatic Cell Count.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.32
- Tabela 2.** Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 62/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.33
- Tabela 3.** Evolução das médias aritmética e geométrica de CCS (em mil células/mL) de indústrias que enviaram amostras para a Clínica do Leite no período de 2006 a 2015.34
- Tabela 4.** Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 7/2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.34
- Tabela 5.** Distribuição de frequência do número de áreas e rebanhos de acordo com as categorias de Contagem de Células Somáticas (CCS) identificadas na análise espacial.49
- Tabela 6.** Distribuição de frequência da contagem de células somáticas (CCS) em 43 rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata de Minas Gerais.51
- Tabela 7.** Prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos da Zona da Mata de Minas Gerais.53
- Tabela 8.** Distribuição de frequência de 43 rebanhos bovinos localizados da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais de acordo com os resultados dos exames microbiológicos.....55

Tabela 9. Médias de contagem de células somáticas (CCS) de 43 rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais de acordo com a presença dos patógenos contagiosos da mastite *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.....56

Tabela 10. Atendimento à IN 7 de 2016 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para 2018, de acordo com os patógenos isolados de 43 rebanhos bovinos leiteiros da Zona da Mata Minas Gerais.....57

Tabela 11. Variação da sensibilidade e especificidade com base na contagem de células somáticas (CCS) do rebanho para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/201760

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia do úbere bovino. 1: membrana delgada; 2: ligamento suspensório medial. Fonte: FONSECA e SANTOS, 2001.25
- Figura 2.** Sistema de ductos e estrutura do alvéolo. Fonte: HOMAN e WATTIAUX, 1995.26
- Figura 3.** Visualização macroscópica das lesões da glândula mamária em casos crônicos de mastite por *Staphylococcus aureus*. Fonte: www.rehagro.com.br Acesso em janeiro 2018.....29
- Figura 4.** Esquema ilustrativo da infecção intramamária por *Staphylococcus aureus*. Fonte: www.rehagro.com.br. Acesso em janeiro de 2018.29
- Figura 5.** Mapa da bacia leiteira de Ji Paraná, Rondônia, e a localização de regiões com rebanhos bovinos leiteiros com baixa, média e alta contagem de células somáticas na região avaliada. Fonte: OLIVEIRA, 2013.35
- Figura 6.** Avaliação de sucessivos estudos de prevalência de *S.agalactiae* entre rebanhos bovinos na Dinamarca, no período de 1989 a 2009. Fonte: KATHOLM e RATTENBORG, 2010.37
- Figura 7.** Teste da hidrólise da esculina. Teste: 1 – Positivo; 2 – Negativo. Foto: Francielly Ávila.45
- Figura 8.** Teste de CAMP (amostras T12-3 e T12-4: Resultados positivos). Foto: Francielly Ávila.45
- Figura 9.** Prova de produção de Coagulase. 1- Positivo, com formação do coágulo. 2- Resultado Negativo. Foto: Francielly Ávila.....45
- Figura 10.** Teste de Voges Proskauer. Amostras em amarelo: resultado negativo. Amostras em vermelho: resultado positivo. Fonte: Francielly Ávila.....46
- Figura 11.** Variação da Contagem de Células Somáticas (CCS) de acordo com as regiões de localização dos rebanhos da Cooperativa LAC, 2015/2016.50

Figura 12. Área sob a curva (Curva ROC) para estimar a probabilidade de presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/2017.59

Figura 13. Variação da sensibilidade e especificidade com base na contagem de células somáticas (CCS) do rebanho para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/2017.61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de Variância

BHI - *Brain Heart Infusion* (Infusão Cérebro e Coração)

CCS- Contagem de células somáticas

CMT- Californian Mastitis Test

CTB- Contagem Total de Bactérias

ESP – Especificidade

EUA- Estados Unidos da América

GD- Grau de dependência espacial

IC- Intervalo de confiança

IDF – International Dairy Federation

IN 7- Instrução Normativa 7

IN 37- Instrução Normativa 37

IN 51- Instrução Normativa 51

IN 62 - Instrução Normativa 62

\log_{10} CCS- Logaritmo na base 10 da contagem de células somáticas

MAPA-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Min.- Mínimo

mL – mililitro

NaCl – Cloreto de Sódio

NMC- National Mastitis Council

RBQL- Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite

S. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

S.aureus- *Staphylococcus aureus*

SEN – Sensibilidade

TI- Tecnologia da informação

UFC- Unidades formadoras de colônia

VP- Voges Proskauer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	Glândula mamária e mastite	25
3.2	Principais agentes causadores de mastite contagiosa.....	28
3.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	30
3.3	Legislação e evolução da contagem de células somáticas em rebanhos bovinos no Brasil.....	31
3.4	Avaliação espacial da contagem de células somáticas de rebanhos bovinos	35
3.5	Estudos de prevalência e sistemas de vigilância epidemiológica para patógenos contagiosos da mastite.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Análise espacial da contagem de células somáticas de rebanhos bovinos leiteiros.....	40
4.1.1	Análise geoestatística.....	40
4.2	Estudo de prevalência dos patógenos	42
4.2.1	Cálculo do tamanho da amostra	42
4.2.2	Relação entre a contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos e isolamento de patógenos contagiosos da mastite	42
4.3	Coleta e análise de amostras.....	43
4.3.1	Análise da contagem de células somáticas de rebanhos	43
4.3.2	Análise microbiológica	43

4.4	Análises estatísticas.....	46
4.4.1	Estimativa de prevalência e Intervalo de confiança.....	46
4.4.2	Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Análise espacial da contagem de células somáticas de rebanhos bovinos ..	48
5.2	Distribuição de frequência da contagem de células somáticas (CCS) dos rebanhos selecionados para o estudo de prevalência dos patógenos contagiosos da mastite	50
5.3	Estimativa da prevalência dos patógenos contagiosos da mastite entre rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata de Minas Gerais.....	52
5.4	Perfil epidemiológico de 43 rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais de acordo com o isolamento dos patógenos contagiosos da mastite	53
5.4.1	Rebanhos sem isolamento de ambos patógenos.....	54
5.4.2	Rebanhos com isolamento de <i>S. aureus</i>	54
5.5	Relação entre a contagem de células somáticas do rebanho de acordo com os resultados dos exames microbiológicos.....	56
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença endêmica nos rebanhos leiteiros em todo o mundo e causa, entre outros problemas, as maiores perdas econômicas relacionadas às doenças da produção (BENNET et al., 1999; HALASA et al., 2007). Anualmente, três em cada dez vacas leiteiras apresentam a forma clínica da doença. Dos bovinos acometidos, 7% são descartados e 1% vai a óbito devido à doença clínica (SMITH, 2006).

A contagem de células somáticas (CCS) é amplamente reconhecida como indicador de saúde da glândula mamária, pois reflete o estado de mastite subclínica de vacas individuais e de rebanhos. Esse parâmetro vem sendo usado na avaliação e monitoramento da saúde da glândula mamária em rebanhos leiteiros em diversos países (SCHUKKEN et al., 2003). Desde 2002, com a publicação da Instrução Normativa 51 (IN51/2002) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a CCS começou a fazer parte dos indicadores de qualidade do leite estabelecidos na legislação brasileira (BRASIL, 2002b).

A partir do início da vigência da IN51/2002 em 2005, grandes captadoras de leite no Brasil começaram a pagar por qualidade e, conseqüentemente, foi observada melhoria em relação à redução da contagem total de bactérias (CTB) (MARTINS et al., 2004; BOTARO et al., 2011; CARDOSO, 2012). Entretanto, o mesmo não foi observado para a CCS ao longo do mesmo período. Mesmo em empresas que pagam por qualidade, o percentual de rebanhos que não atendem o limite de 400.000 células/mL manteve-se constante. Nos Estados Unidos, foi observado que no período de 1995 a 2008 houve a redução de aproximadamente 27% para 22% de rebanhos com média geométrica da CCS superior a 400.000 células/mL (UDDER, 2009). No Reino Unido, foram necessários 22 anos para reduzir em 60% os rebanhos com CCS superior a 400.000 células/mL (BRADLEY, 2002). As informações apresentadas mostram o grande desafio da pecuária leiteira brasileira, considerando que aproximadamente 40 a 50% dos rebanhos possuem média geométrica anual superior a 400.000 células/mL, considerando o tempo necessário para reduzir em 5% e 60% de rebanhos com CCS superior a 400.000 células/mL

nos Estados Unidos e Reino Unido, respectivamente (UDDER, 2009; BRADLEY, 2002).

As decisões relativas ao controle da mastite baseiam-se no custo de casos clínicos e subclínicos em relação aos custos dos procedimentos de manejo (HALASA et al., 2007). Estas decisões podem ser tomadas em três níveis: 1) em nível de região/país; 2) em nível de fazenda e 3) em nível de quarto mamário/vaca. Decisões em nível de região/país são aquelas relacionadas principalmente a campanhas que incluem coleção de dados de CCS de indivíduos e rebanhos (base de dados) de uma determinada região e/ou população específicas de rebanhos bovinos leiteiros para avaliação da variação da CCS no tempo e no espaço (BEEK et al., 1992; KEEFE et al., 1997; HALL et al., 2004; GAY et al., 2006; GAY et al., 2007). Outro exemplo são os estudos de prevalência de patógenos contagiosos da mastite entre rebanhos, que podem fornecer informações sobre a situação epidemiológica da doença em regiões e/ou países (USDA-APHIS, 2007; OLIVEIRA et al., 2013). Decisões em nível de fazenda são aquelas relativas às medidas de controle e prevenção da doença adotadas para todos os animais de um mesmo rebanho, como a realização de desinfecção dos tetos antes e após a ordenha e realização de linha de ordenha (OSTERAS et al., 2005). Os benefícios destas medidas de controle recaem sobre a redução na incidência de casos clínicos e subclínicos e na melhoria da qualidade do leite do rebanho (DECKERS et al., 1996). Exemplos de medidas de controle e prevenção da mastite em nível de indivíduo ou quarto mamário são tratamentos específicos para determinados animais com mastite clínica e descarte de vacas com infecção crônica causado por *S. aureus* (HALASA et al., 2007).

Entre os agentes causadores de mastite dois são frequentemente isolados na maioria dos rebanhos: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. O isolamento e importância desses patógenos em rebanhos bovinos leiteiros, bem como a variação da CCS em função destes patógenos, têm sido relatados por diversos autores (HARMON, 1994; DJABRI et al., 2002; SOUZA et al., 2009). Mastites causadas por estes patógenos resultam em grandes variações no aumento da CCS de vacas e conseqüentemente de rebanhos. Além disso, rebanhos com alta prevalência destes patógenos apresentam constantemente alta CCS (HARMON, 1994; KEEFE, 2012), principalmente por serem patógenos que se caracterizam pela ocorrência de infecções crônicas. O controle e prevenção destes patógenos da

mastite são fundamentais para a redução do impacto econômico bem como o atendimento ao limite máximo estabelecido para 2018 na legislação de 400.000 células/mL.

Rebanhos bovinos localizados em determinada região e/ou vinculados a associação de produtores, cooperativas ou indústrias podem realizar o controle e prevenção de patógenos contagiosos da mastite em nível de região por meio da avaliação no tempo e no espaço da CCS e da prevalência de patógenos contagiosos entre rebanhos. A estruturação de uma base de dados com informações relacionadas a CCS, prevalência de patógenos contagiosos e a relação entre a CCS e estes patógenos pode auxiliar na classificação probabilística individual destes rebanhos em relação a presença destes patógenos. Esta informação seria importante para auxiliar na definição da frequência e tipos de exames e das medidas de controle e prevenção específicas de acordo com os patógenos em nível de rebanho e região. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma classificação baseada em risco (dados probabilísticos) (risco) para presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* em rebanhos bovinos leiteiros localizados Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e vinculados a uma cooperativa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Modelar e estruturar uma base de dados que permita realizar o monitoramento sistemático da saúde da glândula mamária de rebanhos bovinos, para auxiliar o setor produtivo na tomada de decisão no controle e prevenção da mastite em nível de região e de rebanho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estruturar uma base de dados com informações relativas à localização geográfica e contagem de células somáticas de rebanhos para o monitoramento temporal e espacial da saúde da glândula mamária de bovinos leiteiros;
2. Identificar áreas com características comuns em termos de contagem de células somáticas (*clusters*) em uma população específica de rebanhos bovinos;
3. Estimar a prevalência de patógenos contagiosos da mastite (*S. aureus* e *S. agalactiae*) em uma população específica de rebanhos bovinos;
4. Estabelecer um sistema de classificação baseado em risco para presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* com base na variação da CCS e prevalência destes patógenos em uma população específica de rebanhos bovinos leiteiros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GLÂNDULA MAMÁRIA E MASTITE

Embora o úbere da vaca pareça ser uma única unidade, ele é constituído de quatro glândulas mamárias distintas que funcionam independentemente. Normalmente, os quartos anteriores pesam cerca de dois terços dos quartos posteriores, o que se traduz em maior produção de leite nos posteriores. As glândulas do mesmo lado apresentam intercomunicação de vasos sanguíneos e são separadas apenas por um tecido conjuntivo. No entanto as glândulas do lado esquerdo são completamente separadas daquelas do lado direito pelo ligamento suspensório medial, apresentando suprimento sanguíneo, nervoso e ligamentos suspensórios distintos (Figura 1).

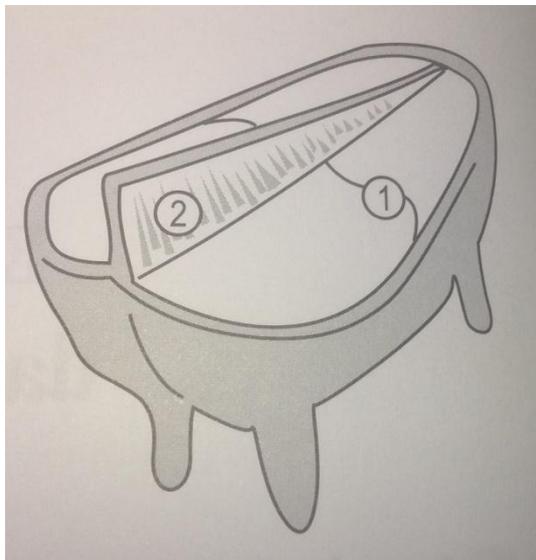


Figura 1. Anatomia do úbere bovino. 1: membrana delgada; 2: ligamento suspensório medial. Fonte: FONSECA e SANTOS, 2001.

A glândula mamária é composta por dois tipos de tecido: o tecido conjuntivo, que pode ser fibroso ou adiposo, e o tecido secretor, que é formado pelas células epiteliais secretoras de leite. O tecido secretório básico, também chamado de

parênquima da glândula mamária, é representado pelo alvéolo. Cada alvéolo apresenta todas as estruturas necessárias para a síntese e escoamento do leite para o sistema de ductos, e posteriormente para cisterna da glândula e do teto (Figura 2) (FONSECA e SANTOS, 2001).

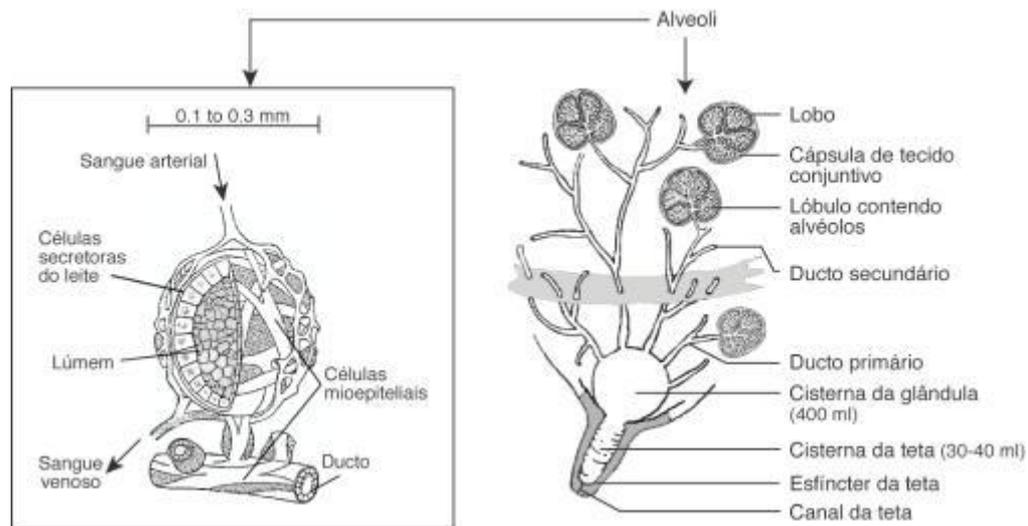


Figura 2. Sistema de ductos e estrutura do alvéolo. Fonte: HOMAN e WATTIAUX, 1995.

A entrada de microrganismos pelo esfíncter do teto na glândula mamária pode resultar em mastite (SMITH, 2006), que é definida como a inflamação da glândula mamária, podendo ser causada por bactérias, leveduras e algas (BRADLEY, 2002), sendo as bactérias as principais causadoras. A mastite pode ser classificada quanto a sua forma de manifestação, sendo clínica ou subclínica, e quanto a sua origem, ambiental ou contagiosa.

A forma clínica apresenta sinais evidentes, tais como edema, hipertermia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. A forma subclínica se caracteriza por aumento do número de células, principalmente os neutrófilos, e alteração na composição do leite, porém não evidentes. Entre as principais alterações destaca-se o aumento da CCS, o aumento dos teores de cloreto de sódio (NaCl) e aumento das proteínas séricas, diminuição do percentual da caseína, da gordura, dos sólidos totais e da lactose do leite. Cabe ressaltar que a mastite subclínica apresenta

prevalência muito maior que a clínica. Dessa forma, considera-se que, em média, a mastite subclínica é responsável por 90 a 95% dos casos da doença (FONSECA e SANTOS, 2001). Deve-se ressaltar que a mastite de qualquer forma ou intensidade reduz a produção leiteira, ocorrendo em muitos casos a perda de uma ou mais glândulas mamárias que se tornam afuncionais. (TOZZETI et al, 2008).

Quanto a origem do patógeno e a forma de transmissão, a mastite ambiental é causada por patógenos presentes no meio ambiente, sendo os principais *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. e *Streptococcus* spp. (FONSECA e SANTOS, 2001). A transmissão pode ocorrer no momento da ordenha, nos intervalos entre ordenhas e no intervalo entre os partos. Geralmente sua forma de apresentação é clínica, promovendo elevação momentânea da CCS, já que o agente é mais facilmente eliminado de forma espontânea (RADOSTITS, 1994).

A mastite contagiosa tem os quartos mamários como reservatório primário dos patógenos, mas eles também podem ser encontrados na pele, no trato respiratório e geniturinário dos animais (SMITH, 2006). O momento da ordenha é determinante para a transmissão destes patógenos entre os animais em lactação. É caracterizada por provocar infecções subclínicas, provocando elevação da CCS (RADOSTITS, 1994). Os principais agentes contagiosos são *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* (FONSECA e SANTOS, 2001).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser realizado a partir do exame físico do úbere e a observação do leite através do teste da caneca de fundo escuro pela alteração na aparência do leite. Já a mastite subclínica pode ser diagnosticada através de exames microbiológicos, da condutividade elétrica, da CCS ou do *California Mastitis Test* (CMT) (TOZZETTI et al., 2008).

O exame microbiológico ou cultura bacteriana do leite total do rebanho, usando meios de cultura seletivos, é um método sensível e específico para verificar a presença da infecção por *S. aureus* e *S. agalactiae* no rebanho. Este método tem sido usado no Brasil em outros países para realização de estudos de prevalência, monitoramento de patógenos contagiosos e triagem de rebanhos (BRITO et al, 1998, ANDERSEN, et al., 2003; USDA-APHIS, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

3.2 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE MASTITE CONTAGIOSA

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus destaca-se por ser um dos agentes mais importantes causadores de mastite em bovinos. Possui capacidade de produzir fatores de virulência que o auxiliam na sobrevivência em diferentes hospedeiros e regiões do corpo (CONRADI, 2014). Entre as características morfo-fisiológicas de *S. aureus*, destacam-se as seguintes: são cocos Gram positivos, coagulase positivos, α ou β -hemolíticos, utilizam maltose e manitol e formam colônias pigmentadas. Podem apresentar polimorfismo, o que acarreta muitos problemas para o controle das infecções, uma vez que afetam diretamente o sistema imunológico da vaca e sua suscetibilidade às mesmas (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, *S. aureus* está presente em 50% das infecções da glândula mamária de bovinos leiteiros (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). De acordo com o Conselho Nacional de Mastite (NMC) dos Estados Unidos da América (EUA), rebanhos leiteiros que não adotam medidas de controle para mastite apresentam cerca de 50% das vacas infectadas, em média, em dois quartos (NMC, 1996). As estimativas brasileiras apontam valores de 20%, 38% e até 71% para a prevalência da doença em rebanhos dos estados de Minas Gerais e São Paulo (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Na maioria dos países, *S. aureus* é a causa predominante de mastite subclínica e também é frequentemente isolado de mastite clínica (BRAMLEY e DODD, 1984). Mastites causadas por *S. aureus* podem variar de forma subclínica a hiperaguda, tendo a forma subclínica crônica com episódios clínicos como a mais observada (QUINN et al., 2002). Os casos de mastite subclínicos e crônicos são de longa duração, podendo persistir por semanas ou meses. Resultam em atrofia do alvéolo mamário, fibrose e formação de micro abscessos, o que limita a ação fagocítica de células e a ação de antibióticos, causando infecções profundas no tecido mamário, com episódios de liberação de bactérias dos quartos mamários

infectados acompanhados de altas CCS (PYÖRÄLÄ, 1995; QUINN et al., 2002) (Figuras 3 e 4).

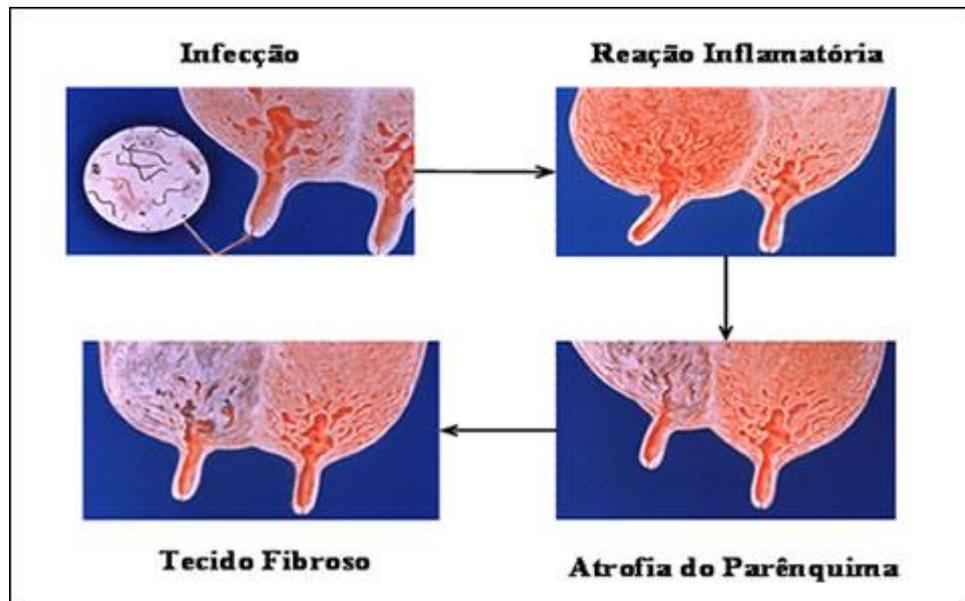


Figura 3. Visualização macroscópica das lesões da glândula mamária em casos crônicos de mastite por *Staphylococcus aureus*. Fonte: www.rehagro.com.br Acesso em janeiro 2018.

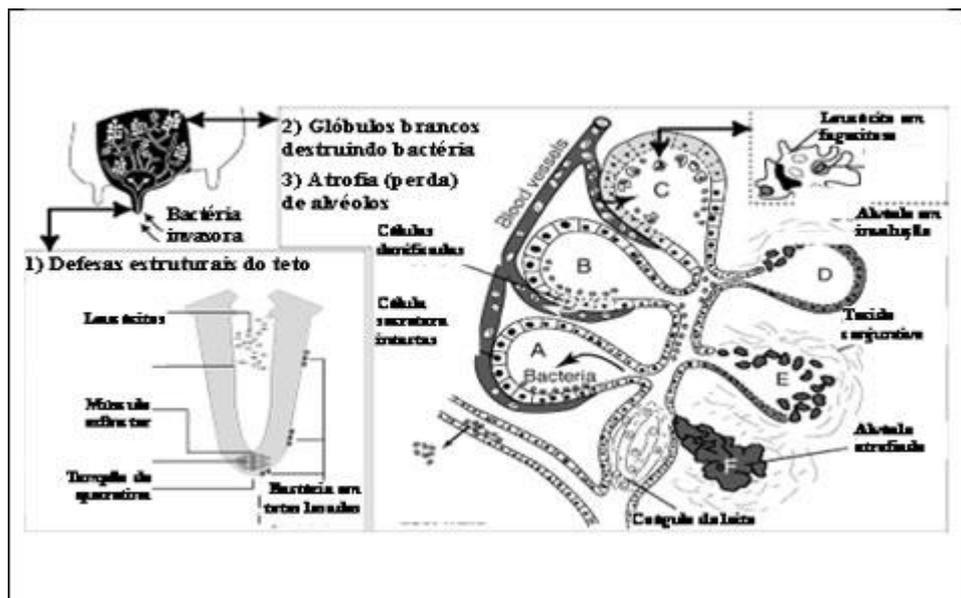


Figura 4. Esquema ilustrativo da infecção intramamária por *Staphylococcus aureus*. Fonte: www.rehagro.com.br. Acesso em janeiro de 2018.

As mais importantes fontes de infecção para *S. aureus* dentro do rebanho são as glândulas mamárias infectadas, o ducto do teto colonizado, os tetos lesionados infectados, o conjunto de teteiras do equipamento de ordenha, o pano comum para secar tetos e mãos do ordenhador, sendo o momento da ordenha o mais importante na transmissão de *S. aureus* entre vacas (BRAMLEY e DODD, 1984).

O tratamento com antibiótico dos casos clínicos frequentemente falha em eliminar o estado de infecção pelo patógeno em questão, particularmente em vacas mais velhas e com histórico de episódios clínicos recidivos da doença (BRAMLEY e DODD, 1984; BRAMLEY, 1992). A infecção crônica causada por *S. aureus* é considerada como critério para o descarte de vacas do rebanho e este procedimento é a principal medida de controle e prevenção em rebanhos com alta prevalência (KEEFE, 2012).

3.2.2 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae é um agente altamente infeccioso e pelo fato de sobreviver somente na glândula mamária é chamado de “parasita” obrigatório da glândula mamária. Coloniza a superfície da glândula provocando lesões teciduais durante seu crescimento e multiplicação, mas não invade o tecido secretor como *S. aureus*.

S. agalactiae foi o primeiro microrganismo reconhecido como causa de mastite, em 1896 (ELVINGER e NATZKE, 1992). A infecção por este agente pode resultar em infecção clínica aguda até subclínica crônica (BRAMLEY e DODD, 1984). O curso da infecção é semelhante ao da infecção crônica subclínica causada por *S. aureus*, com ciclos de liberação de bactérias acompanhados de alta CCS (KEEFE, 2012; QUINN et al., 2002). *S. agalactiae* produz alta CCS em animais individuais, o que influencia significativamente na CCS do rebanho (KEEFE, 2012). Este patógeno localiza-se somente na glândula mamária, com sobrevivência restrita fora do úbere e é altamente sensível à penicilina. Devido a estas características tem sido erradicado até mesmo de alguns países (KEEFE, 2012). Sua transmissão ocorre entre os animais durante o momento da ordenha principalmente por fômites e bezerros, por meio do leite contaminado (KEEFE, 2012).

Pautados nestas características, alguns países têm trabalhado em programas regionais ou nacionais com o objetivo de erradicar *S. agalactiae*. A presença deste patógeno no rebanho foi associada a penalidades relacionadas ao não atendimento dos limites mínimos para CCS do rebanho no Canadá e resíduo de antibiótico no leite, de outubro de 1992 a março de 1993 (KEEFE, 2012). Para que *S. agalactiae* seja eliminado de um rebanho, é recomendada a chamada *blitz* terapia, ou seja, todos os animais infectados são tratados simultaneamente com antibiótico intramamário, com o objetivo de reduzir a prevalência entre os animais até eliminar o agente do rebanho (CRUZ et al., 2004; KEEFE, 2012; MENDONÇA et al., 2018).

Quando um rebanho está infectado com *S. agalactiae*, geralmente há uma alta prevalência de animais infectados dentro do rebanho devido a alta liberação de bactérias pela glândula mamária, podendo causar aumento na Contagem Bacteriana Total (CTB) (KEEFE, 2012). Entre 1976 e 1982, um estudo realizado nos estados do Mississippi e Massachusetts, Estados Unidos, mostrou que a prevalência média de animais infectados por *S. agalactiae* dentro de rebanhos variou de 39,5 a 44,7% (KEEFE, 2012). De 48 rebanhos, 27 (56%) possuíam no mínimo uma vaca infectada por *S. agalactiae* no Estado de Ohio, Estados Unidos, onde a média de quartos e vacas infectadas foi de 4,1 e 10,0%, respectivamente (BARTLETT et al., 1992). É importante ressaltar que o foco de controle de *S. agalactiae* está na erradicação por meio do tratamento dos animais infectados e, quando necessário, o descarte (KEEFE, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

3.3 LEGISLAÇÃO E EVOLUÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS BOVINOS NO BRASIL

Em 2002 foi publicada a Instrução Normativa 51 (IN 51/2002) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no intuito de aperfeiçoar e modernizar a legislação federal com relação a definição de requisitos mínimos de qualidade para indicadores composicionais e higiênico-sanitários do leite cru produzido no Brasil. A nova legislação entrou em vigor no ano de 2005, para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, e em 2007 para as regiões Norte e Nordeste, sendo os limites de CCS reduzidos ao longo de seis anos, tempo estimado como

suficiente para que a maioria dos produtores pudessem se enquadrar na nova legislação (Tabela 1)(Brasil, 2002 b).

Tabela 1. Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.

	A partir de		
Sul, Sudeste e Centro Oeste	Julho de 2005	Janeiro de 2008	Julho de 2011
Norte e Nordeste	Julho de 2007	Janeiro de 2010	Julho de 2012
	Limites máximos		
CCS (x 1.000 células/mL)	1.000	750	400

CCS: contagem de células somáticas. Fonte: Adaptado de Brasil, 2002.

Para avaliar e monitorar a qualidade do leite produzido nos rebanhos bovinos brasileiros foi instituída a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), por meio da Instrução Normativa 37, de 2002 do MAPA (BRASIL, 2002a). O monitoramento dos indicadores de qualidade do leite, especificamente a CCS dos rebanhos bovinos analisados pela RBQL de 2005 a 2011, mostra que não houve grandes variações em relação aos limites estabelecidos na IN51/2002, sugerindo que pouco se avançou na melhoria deste indicador de qualidade do leite. As análises dos resultados de CCS durante este período mostram uma situação preocupante, pois aproximadamente 40 a 50% das amostras não atendem os limites estabelecidos na legislação, de 400.000 células/mL (DÜRR et al., 2004; MESQUITA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; SOUZA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017)

Durante o período de 2008 a 2011 também foi observado que o percentual de rebanhos que não atendiam aos limites estabelecidos na IN51/2002 continuava o mesmo para CCS e CTB. Desta forma, a publicação da Instrução Normativa 62 do Mapa, de 29/12/2011 (IN62/2011) (BRASIL, 2011) foi uma resposta às dificuldades ocorridas para a implantação da IN51/2002 (Tabela 2). Essas medidas, apesar de

positivas por estender os prazos para atendimento aos limites de CCS e CTB, não foram a solução para os problemas e sim apenas a aceitação da realidade de que muitos produtores de leite no Brasil, no momento, não têm condições de atender a legislação apresentada (SILVA, 2012; RODRIGUES et al., 2017)

Tabela 2. Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 62/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.

	A partir de			
	Sul, Sudeste e Centro Oeste	Julho de 2008	Janeiro de 2011	Julho de 2014
Norte e Nordeste	Julho de 2010	Janeiro de 2013	Julho de 2015	Julho de 2017
	Limites máximos			
CCS (x 1.000 células/mL)	750	600	500	400

Fonte: Adaptado de Brasil, 2011.

Um estudo realizado pela Clínica do Leite na ESALQ/USP mostrou a evolução da CCS de 2006 a 2015 de indústrias processadoras de leite dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Ceará e Bahia (Tabela 3). Este estudo mostrou não haver qualquer evolução na redução da CCS dos rebanhos brasileiros estudados neste período (CLÍNICA DO LEITE, 2016).

E novamente, em 3 de maio de 2016, o MAPA publicou a Instrução Normativa 7 (IN7/2016), que altera a IN n. 62/2011, estendendo os prazos estipulados por mais dois anos. Com isso, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste deverão se adequar às normas até julho de 2018, e as regiões Norte e Nordeste em julho de 2019 (Tabela 4).

Tabela 3. Evolução das médias aritmética e geométrica de CCS (em mil células/mL) de indústrias que enviaram amostras para a Clínica do Leite no período de 2006 a 2015.

CCS (x 1.000 células/mL)		
Ano	Média Aritmética	Média Geométrica
2006	485	341
2007	487	345
2008	498	348
2009	530	373
2010	544	389
2011	547	389
2012	356	356
2013	513	352
2014	529	358
2015	593	400

CCS: contagem de células somáticas. Fonte: CASSOLI et al, 2016.

Tabela 4. Limites máximos estabelecidos na Instrução Normativa 7/2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos de acordo com as Regiões do Brasil e período estabelecido para redução.

	A partir de			
	Julho de	Janeiro de	Julho de	Julho de
Sul, Sudeste e Centro Oeste	2008	2011	2014	2018
Norte e Nordeste	2010	2013	2015	2019
	Limites máximos			
CCS (x 1.000 células/mL)	750	600	500	400

Fonte: Adaptado de Brasil, 2016.

3.4 AVALIAÇÃO ESPACIAL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE REBANHOS BOVINOS

O desenvolvimento e expansão de sistemas de monitoramento tem sido significativo devido ao grande progresso, sofisticação e disponibilidade de métodos estatísticos, *softwares*, computadores e habilidade em trabalhar com grandes bases de dados, que permitem quantificar e identificar relações temporais e espaciais que auxiliam na tomada de decisão no controle de doenças (LEBLANC et al., 2006). Em função dos recursos tecnológicos disponíveis atualmente e a aplicação de métodos estatísticos e geoestatísticos, é possível realizar um monitoramento temporal e espacial da CCS em função dos limites estabelecidos na legislação bem como identificar áreas de risco com características comuns em termos de CCS e sua variação ao longo do tempo (GAY et al., 2006; GAY et al., 2007). Estes mapas de CCS de rebanhos podem ser usados pelo setor público e privado na tomada de decisão em nível de região de um estado ou país, com foco na redução de CCS em áreas consideradas críticas ou prioritárias. Estudos realizados nos Estados de Rondônia e Espírito Santo (SOUZA et al., 2012b) mostraram regiões com características comuns em termos de CCS, identificando áreas com contagens superiores a 400.000 células/mL (Figura 5).

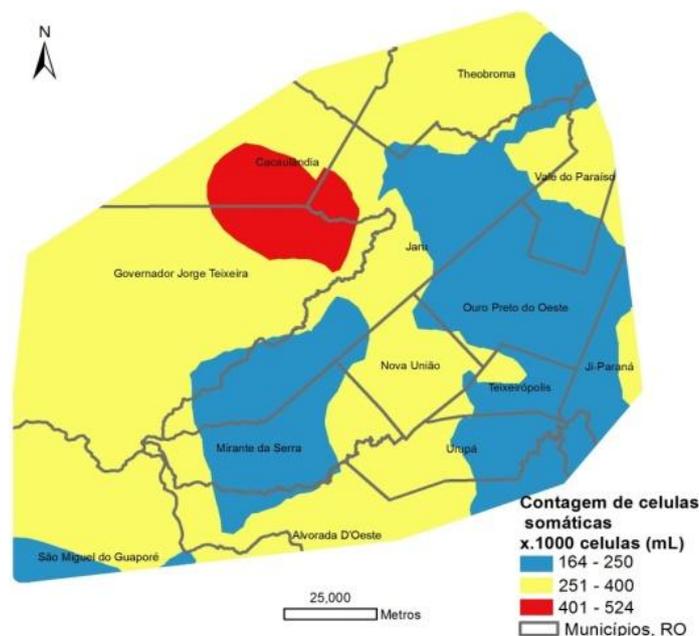


Figura 5. Mapa da bacia leiteira de Ji Paraná, Rondônia, e a localização de regiões com rebanhos bovinos leiteiros com baixa, média e alta contagem de células somáticas na região avaliada. Fonte: OLIVEIRA, 2013.

3.5 ESTUDOS DE PREVALÊNCIA E SISTEMAS DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE

Estudo realizado nos Estados Unidos em 2007 (USDA, 2008) estimou a prevalência dos patógenos contagiosos entre os rebanhos leiteiros. *S. aureus* foi o patógeno contagioso com maior prevalência nos rebanhos, estando presente em 43% dos rebanhos e *S. agalactiae* em 2,6% dos rebanhos.

No Brasil estudos de prevalência mostram o quanto nossos rebanhos ainda estão distantes de atingir um controle razoável de saúde da glândula mamária relacionado aos patógenos contagiosos, principalmente *S. agalactiae*. Estudo realizado nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro mostraram prevalências para *S. aureus* de 93% e para *S. agalactiae* de 41% em rebanhos compostos por animais da raça Holandesa (OLIVEIRA, 2013).

Do ponto de vista de país, estado e região, o desenvolvimento de ferramentas para tomada de decisões para sistemas de vigilância epidemiológica, pode ser uma estratégia para ações governamentais visando a melhoria da qualidade do leite. Um exemplo bastante ilustrativo ocorreu na Dinamarca, onde desde 1963 existe um sistema de vigilância epidemiológica para *S. agalactiae* em rebanhos bovinos. A partir do momento que um rebanho era identificado como positivo, a erradicação do patógeno foi obrigatória até 1988. Entretanto, em 1995, a contribuição do governo dinamarquês no diagnóstico dos rebanhos e animais parou e houve mudanças no programa, principalmente na regulamentação de movimentação de animais para comércio, participação de feiras e exposições e comunicação de rebanhos infectados (KATHOLM e RATTENBORG, 2010). Assim, resultados de sucessivos estudos de prevalência entre rebanhos para *S. agalactiae* no período de 1989 a 2000 variou entre 1 e 2%. Desde 2000, tem sido observado um aumento gradual na prevalência de rebanhos infectados, chegando a 5,7% em 2008 (Figura 6).

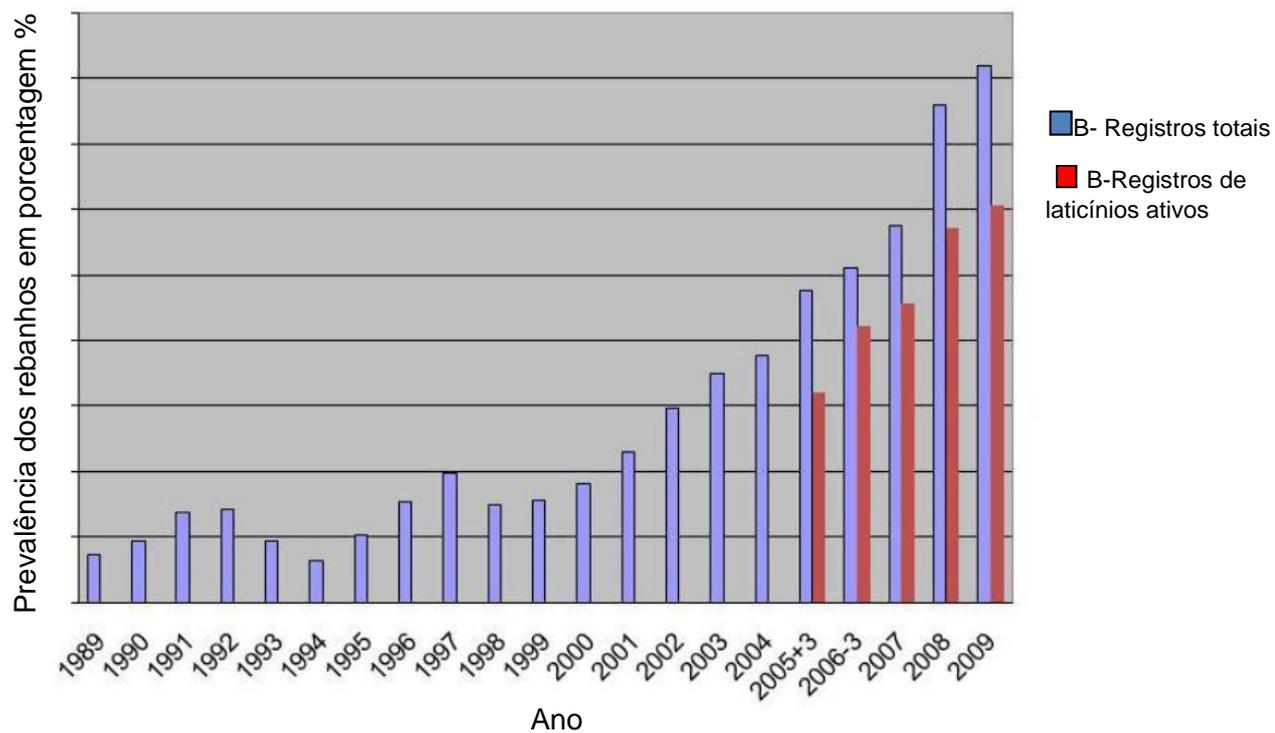


Figura 6. Avaliação de sucessivos estudos de prevalência de *S. agalactiae* entre rebanhos bovinos na Dinamarca, no período de 1989 a 2009. Fonte: KATHOLM e RATTENBORG, 2010.

O aparecimento de novos rebanhos infectados por *S. agalactiae* na Dinamarca é preocupante e deve haver uma campanha para encorajar os proprietários destes rebanhos na erradicação do patógeno. Neste particular, percebe-se a importância do sistema de vigilância epidemiológica para *S. agalactiae*, no qual os sucessivos estudos de prevalência mostram uma tendência de aumento e identificação de rebanhos infectados o mais rapidamente possível e auxiliando governo, cooperativas, indústrias, associação de produtores e produtores na tomada de decisão em nível de rebanho na prevenção, controle e erradicação deste patógeno (KATHOLM e RATTENBORG, 2010).

Outro ponto importante levantado por meio do sistema de vigilância epidemiológica foi a tendência observada de aumento do número de rebanhos infectados na Dinamarca a partir do momento que não houve obrigatoriedade na erradicação do patógeno e mudanças nas normas relativas ao programa de erradicação, ressaltando a suspensão do pagamento dos exames para diagnóstico pelo governo. O sistema de vigilância epidemiológica para *S. agalactiae* mostrou ser uma ferramenta importante para orientar produtores em relação ao estado de

infecção dos rebanhos. Entretanto, a metodologia necessária para estabelecer um sistema de vigilância pode ser aplicada para um sistema de monitoramento do *S. aureus*, tendo em vista a maior dificuldade de eliminação deste patógeno do rebanho por meio de tratamento intramamário.

O objetivo dos sistemas de monitoramento e vigilância epidemiológica veterinária é gerar informação pertinente e promover o seu uso, com propósito de tomar medidas de melhoria da saúde dos animais e rebanhos. Entre os objetivos específicos estão a detecção de variações de tendências, como foi observado na Dinamarca, traçar o perfil da enfermidade em uma população específica, priorizar os problemas em função da distribuição temporal e espacial da doença e agir em função do diagnóstico da situação. Dentre as estratégias e ações do sistema de vigilância epidemiológica veterinária estão a coleta, a análise e a disseminação de informações relevantes para a prevenção, controle e erradicação de doenças (STÄRK et al., 2006)

O monitoramento de populações específicas geralmente é realizado por meio de estruturação de banco de dados para armazenamento de informações em equipamentos de tecnologia da informação (TI). Estes dados são analisados e interpretados por meio de programas estatísticos e de georreferenciamento, para disseminação de informações, recomendações e ações. Os sistemas de vigilância epidemiológica devem ser avaliados em relação ao investimento e retorno que promovam, ou seja, em relação ao custo e ao benefício proporcionado por este sistema. Sistemas de vigilância epidemiológica baseados em risco ou informações prévias da enfermidade podem ser mais eficientes, ou seja, identificar os casos de animais ou rebanhos infectados com o menor custo possível (STÄRK et al., 2006). Portanto, informações prévias sobre a prevalência da doença, distribuição espacial e fatores de risco podem auxiliar no delineamento e estruturação de sistemas de vigilância epidemiológica baseado em risco, que podem ser mais eficientes por possuir alta sensibilidade na identificação de rebanhos infectados com o menor custo possível.

Com base nas principais formas de controle recomendadas para os patógenos contagiosos da mastite, conhecer o padrão de infecção do rebanho é fundamental para a definição da estratégia correta para a adoção de descartes e/ou tratamentos de animais, tendo em vista que o padrão de infecção do rebanho pode

ser *S. aureus* e/ou *S. agalactiae*. Entretanto, é necessário também conhecer a prevalência entre rebanhos e entre animais de um rebanho para poder direcionar a tomada de decisão em nível de região e rebanho, respectivamente.

A tomada de decisão em nível de região ficará a critério da cooperativa, indústria e associação, em relação à forma de comunicação dos resultados, definição e adoção de uma campanha ou programa com objetivos e metas definidos, investimentos necessários, possíveis intervenções e avaliação de custo/benefício. A tomada de decisão em nível de rebanho fica a critério do produtor vinculado à cooperativa, indústria ou associação em relação a participar da campanha ou programa, adotar o descarte e/ou tratamento de animais com mastite clínica e subclínica, realizar monitoramento e vigilância de patógenos contagiosos da mastite por meio de análises laboratoriais periódicas e o custo/benefício destes procedimentos de controle. Como estes patógenos exercem uma grande influência sobre a CCS, a redução da CCS de rebanhos passa necessariamente por estudos de prevalência com objetivo de quantificar a presença destes patógenos entre rebanhos e entre animais dentro de um rebanho. Em relação à amostragem realizada para o estudo de prevalência, a amostragem aleatória estratificada por região, classificada em função da CCS, pode mostrar diferença na prevalência destes patógenos de acordo com a região (OLIVEIRA, 2013), gerando informação que pode auxiliar as cooperativas, as indústrias e as associações na tomada de decisão em nível de região.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado utilizando a população de bovinos leiteiros vinculados à Cooperativa dos Produtores de Leite de Leopoldina de Responsabilidade Ltda. (LAC), com 123 tanques de expansão, no período de 2014 a 2017. Durante este período, a cooperativa enviou amostras de leite de todos os tanques de expansão para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite, para realização da contagem de células somáticas em atendimento a IN 51/2002.

4.1 ANÁLISE ESPACIAL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE REBANHOS BOVINOS LEITEIROS

As coordenadas geográficas dos tanques de expansão foram obtidas através de levantamento realizado previamente pela cooperativa em cumprimento à legislação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011).

A avaliação da dependência espacial entre as coordenadas geográficas dos rebanhos com tanque individual e a média geométrica anual da contagem de células somáticas foi realizada por meio de semivariogramas e os mapas de isolinhas por meio do método de Krigagem, conforme descrito por Vieira (2000) e aplicado por Souza et al. (2012a; 2012b) e Oliveira (2013).

4.1.1 Análise geoestatística

As informações utilizadas para a análise geoestatística consideram a hipótese de auto correlação ou dependência espacial entre os dados georreferenciados. Para verificar a dependência espacial das variáveis, interpolar dados e elaborar os mapas, foi empregada a análise geoestatística segundo Vieira (2000). Foram construídos semivariogramas, partindo das pressuposições de estacionariedade da hipótese intrínseca e do cálculo da semivariância $g(h)$ estimada pela equação 1:

$$g(h) = \frac{1}{2N(h)} \cdot \sum_{i=1}^N [Z^N(x_i) - Z(x_i + h)]^2 \quad (1)$$

em que $N(h)$ é o número de pares dos valores medidos $Z(x_i)$, $Z(x_i+h)$, separados por um vetor h . É esperado, segundo Vieira (2000), que medições localizadas próximas sejam mais parecidas entre si do que aquelas separadas por grandes distâncias, isto é, que aumente $\gamma(h)$ com a distância h até um valor máximo, no qual se estabiliza em um patamar correspondente à distância limite de dependência espacial, sendo o alcance. Medições localizadas a distâncias maiores que o alcance terão distribuição aleatória, razão pela qual serão independentes entre si. Os semivariogramas com dependência espacial foram ajustados com o modelo matemático de melhor correspondência. Os programas computacionais e procedimentos para construção e ajuste do modelo do semivariograma foram desenvolvidos por Vieira et al. (2000).

Calculou-se o grau de dependência espacial (GD), que é a proporção em porcentagem do partial sill (C_1) em relação ao patamar (C_0+C_1) (Equação 2), sendo, segundo Zimback (2001) e Trangmar et al. (1985), dependência fraca <25%, dependência moderada entre 26% a 75% e dependência forte > 75%.

$$GD = \left(\frac{c_1}{c_0 + c_1} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Uma vez que o semivariograma representa a variabilidade espacial dos dados, a análise geoestatística permitiu a análise dos dados, comparando-se os parâmetros de ajuste dos semivariogramas para cada uma das variáveis estudadas. Havendo dependência espacial demonstrada pelo semivariograma, podem-se estimar valores para qualquer outro local que não foi amostrado, usando-se a krigagem, que, segundo Vieira et al. (2000), estima os valores com condições de não tendenciosidade e com desvios mínimos em relação aos valores conhecidos, ou seja, com variância mínima (Equação 3):

$$\sum_{j=1}^N \tau_j y(X_i, X_j) + \mu = y(X_i + X_0), i = 1, N \quad \sum_{j=1}^N \tau_j = 1 \quad (3)$$

E que $\gamma(X_i, X_j)$ é a semivariância estimada, usando o modelo ajustado ao semivariograma, correspondente à distância entre os pontos localizados na posição X_i e X_j e $\gamma(X_i, X_0)$ é a semivariância correspondente à distância entre os pontos localizados na posição X_i e X_0 . Valores de peso 1 e um valor do multiplicador de Lagrange, m , associado com a minimização da variância, são gerados e com os

valores de z_i podem-se estimar valores (Z) no espaço amostrado para qualquer posição X_0 . Com os valores estimados (Equação 4), foram construídos mapas de isolinhas, em função da coordenada geográfica através do sistema de informação geográfica ArcGIS (ESRI, 2005). O uso da krigagem como interpolador permite mostrar a variabilidade espacial de determinada área, pois a partir dela é possível a construção de mapas de isolinhas.

$$z^*(x_0) = \sum_{i=1}^N \tau_j \cdot z(x_i) \quad (4)$$

4.2 ESTUDO DE PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS

4.2.1 Cálculo do tamanho da amostra

A amostragem da população alvo (universo amostral = 212 rebanhos) para estimar a prevalência de patógenos contagiosos da mastite (*S. aureus* e *S. agalactiae*) foi realizada por meio de amostragem aleatória simples. O cálculo da amostragem foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Petrie e Watson (2009) e usando o programa Epitools® (SERGEANT, 2014). Os parâmetros usados para a realização da amostragem foram: prevalência esperada entre rebanhos para os patógenos contagiosos da mastite de 50%. O erro amostral de 15% e o nível de significância de 95% foi usado. O cálculo do número de rebanhos necessários para o estudo com os parâmetros informados foi 36. Para realização do estudo, foram selecionados 43 rebanhos com o propósito de que caso saísse algum rebanho do estudo, o número mínimo de 36 rebanhos fosse mantido.

4.2.2 Relação entre a contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos e isolamento de patógenos contagiosos da mastite

As CCS dos rebanhos foi transformada para \log_{10} para comparação de médias, de acordo com os resultados do isolamento dos patógenos contagiosos da mastite, por meio da análise de variância (ANOVA) e caso houvesse diferença, a identificação destas pelo teste de Bonferroni.

A categorização dos dados de CCS foi feita em dois grupos, sendo um grupo composto por rebanhos com a média geométrica anual inferior ou igual a 400.000

células/mL e outro superior a 400.000 células/mL, para avaliação da associação entre CCS e perfil de isolamento dos patógenos nos rebanhos. O limite de 400.000 células/mL foi definido com base no menor limite máximo permitido para CCS estabelecido na legislação. Para avaliar a associação entre as categorias de CCS e perfil de isolamento dos patógenos contagiosos da mastite (perfil epidemiológico) foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para mostrar a relação entre a sensibilidade e a especificidade dos resultados de CCS do rebanho em relação ao isolamento de *S. aureus* e/ou *S. agalactiae* foi usada o conceito de curva ROC (Receiver Operating Characteristic).

4.3 COLETA E ANÁLISE DE AMOSTRAS

4.3.1 Análise da contagem de células somáticas de rebanhos

Foram coletadas mensalmente amostras de leite de todos os tanques de expansão da cooperativa para análise da CCS no período de abril de 2014 a novembro de 2017. As amostras foram coletadas em frascos de 50 mL contendo conservante 2-bromo 2-nitropropano 1,3-diol (Bromopol), de acordo com os procedimentos descritos por Brito (2001). As amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável logo após a coleta e transportadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de leite para análise de CCS. A CCS dos rebanhos foi realizada pelo método de citometria de fluxo em equipamento automatizado (Bentley – Somacount 300), de acordo com o IDF (2006).

4.3.2 Análise microbiológica

Foram coletadas 3 amostras de leite do tanque de expansão de cada um dos 43 rebanhos selecionados, no período de junho de 2016 a novembro de 2017, totalizando 129 amostras para isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* para o estudo de prevalência. Este procedimento de três coletas tem como objetivo alcançar o máximo de sensibilidade e especificidade para isolamento de ambos patógenos. Desta forma, a estimativa da prevalência aparente será a mais próxima possível da prevalência real. A coleta, o armazenamento e o transporte de amostras para

isolamento dos patógenos contagiosos dos rebanhos selecionados na amostragem foram realizados pelos técnicos vinculados à cooperativa, após treinamento pela equipe do projeto. Caso o proprietário não tivesse mais interesse em participar do projeto após a seleção, o rebanho seria repostado por outro com o mesmo número de animais. As amostras de leite foram coletadas diretamente em frascos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável logo após a coleta e congeladas para serem transportadas e processadas em bateria. Os exames bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, de acordo com Brito et al. (1998), como descrito a seguir.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente para que fossem realizadas diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) em solução salina. Foi inoculado 0,1 mL de cada amostra sem diluir e também das diluições 10^{-1} e 10^{-2} em placas de Ágar Sal Manitol (para isolamento de *S. aureus*) e no meio de Edwards (para isolamento de *S. agalactiae*). Incubou-se a 35°C por 48 h. Realizou-se a leitura das placas para seleção de 5 colônias típicas dos patógenos de acordo com as características morfológicas das colônias e posteriormente inoculou-se cada uma das colônias selecionadas em ágar BHI. As placas de ágar BHI foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após esta etapa procedeu-se à realização dos testes confirmatórios. A confirmação de *S. agalactiae* foi realizado por meio dos testes da hidrólise da esculina e teste de CAMP (Figuras 7 e 8), crescimento em meio de bile-esculina, hidrólise do hipurato de sódio e da esculina e crescimento em presença de 6,5% de NaCl.

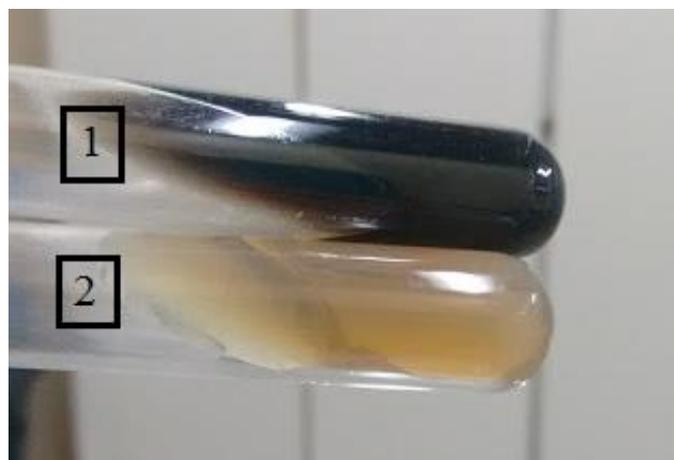


Figura 7. Teste da hidrólise da esculina. Teste: 1 – Positivo; 2 – Negativo. Foto: Francielly Ávila.



Figura 8. Teste de CAMP (amostras T12-3 e T12-4: Resultados positivos). Foto: Francielly Ávila.

A confirmação de *S. aureus* foi feita pela prova da coagulase (Figura 9) e pela reação de *Voges Proskauer* (VP) (Figura 10).

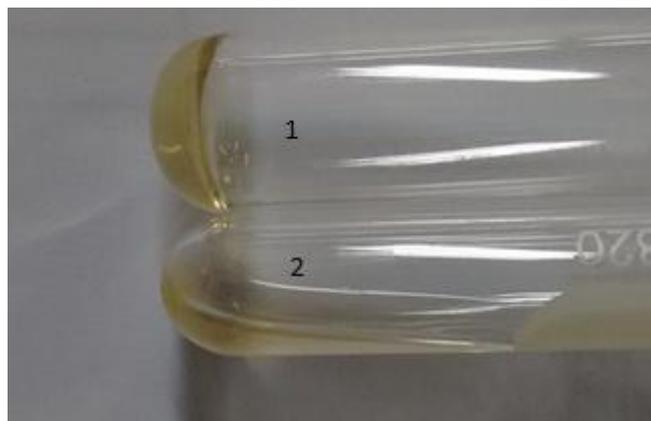


Figura 9. Prova de produção de Coagulase. 1- Positivo, com formação do coágulo. 2- Resultado Negativo. Foto: Francielly Ávila.



Figura 10. Teste de Voges Proskauer. Amostras em amarelo: resultado negativo. Amostras em vermelho: resultado positivo. Fonte: Francielly Ávila.

4.4 ANÁLISES ESTADÍSTICAS

4.4.1 *Estimativa de prevalência e Intervalo de confiança*

O cálculo das prevalências e seus respectivos intervalos de confiança, foram baseados nas seguintes fórmulas:

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{N}^\circ \text{ amostras com isolamento de } S. \text{ aureus ou } S. \text{ agalactiae}}{\text{número total de amostras}}$$

O intervalo de confiança de 95% para a prevalência foi estimado de acordo com Pfeiffer (2010):

$$IC \ 95\% = p \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Onde :

p= Prevalência de *S. aureus* ou de *S. agalactiae*

n= total de rebanhos selecionados e analisados por meio de exames microbiológicos

4.4.2 Classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*

O sistema de classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para *S. aureus* e *S. agalactiae* contará com informações prévias sobre a dependência espacial encontrada para a CCS associado à estimativa de prevalência e à CCS do rebanho individualmente.

Os rebanhos que apresentarem isolamento de *S. aureus* e/ou *S. agalactiae* nos exames microbiológicos entrarão na base de dados de rebanhos com isolamento de um ou ambos patógenos. Esta probabilidade será calculada em função de duas probabilidades, sendo uma a probabilidade do rebanho estar localizado em uma área classificada como de alta CCS, e a outra, a probabilidade do rebanho estar infectado em função do estudo de prevalência e relação entre a CCS dos rebanhos com isolamento dos patógenos contagiosos. A condição primária para realizar a classificação dos rebanhos com base em risco foi a identificação de uma dependência espacial no mínimo moderada ($GD > 25\%$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ESPACIAL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE REBANHOS BOVINOS

O semivariograma foi ajustado com o modelo exponencial e apresentou grau de dependência espacial e coeficiente de determinação fracos ($GD < 0,25$; $r^2 < 0,13$) (ZIMBACK, 2001; TRANGMAR et al., 1985), tendo como valores 125.000, 104.000 e 228.234 para os parâmetros a , C_0 e C_1 , respectivamente (Figura 11). O melhor ajuste possível alcançado no modelo exponencial foi para três categorias de CCS de rebanhos (inferior a 250.000 células/mL; entre 250.000 e 600.000 células/mL e superior a 600.000 células/mL). Os resultados do modelo não permitem extrapolar os parâmetros estimados para explicar a variação da CCS no espaço e o alcance (distância) da dependência espacial.

Além de ter sido observada dependência espacial fraca para a CCS na análise de semivariância, o mapa de isolinhas gerado mostra que as áreas de alta CCS (CCS superior a 600.000 células/mL) não foram contínuas. Dentro da localização geográfica dos rebanhos, foram identificadas 24 áreas com potencial de serem classificadas como aglomerados de rebanhos, ou seja, com características comuns em termos de CCS. Foram identificadas seis (25%) áreas com CCS inferior a 250.000 células/mL e dentro destas áreas, sete (5,7%) rebanhos. Estas áreas não podem ser consideradas como aglomerados (clusters), pois foi observado um rebanho em seis áreas e dois rebanhos em uma área (Tabela 5), tendo em vista que para ser classificado como aglomerados necessariamente deve haver um conjunto de rebanhos no espaço definido pela análise de semivariância.

Para os rebanhos com CCS entre 250.000 e 600.000 células/mL, foram identificadas três áreas, sendo duas áreas com dois rebanhos e uma área com 56 rebanhos. Estes 56 rebanhos localizados dentro de uma área representam 45,5% do total de rebanhos usados na análise espacial e 93,3% dos rebanhos da categoria de CCS entre 250.000 e 600.000 células/mL. Entretanto, esta área contínua está permeada por 14 áreas descontínuas de rebanhos classificados na categoria de CCS superior a 600.000 células/mL. Desta forma, observando os resultados em

conjunto do grau de dependência espacial e a descontinuidade de áreas de acordo com as categorias de CCS, não foi observado no presente estudo a identificação de aglomerados de rebanhos de acordo com o histórico de CCS e com a metodologia usada. Um trabalho realizado na Zona da Mata de Minas Gerais identificou dependência espacial moderada ($GD=37,6$; $r_2=0,31$) com a mesma metodologia usada no presente estudo para a população de rebanhos compostos por animais da raça Holandesa (OLIVEIRA, 2013). Entretanto, no estudo conduzido por Oliveira (2013), os rebanhos bovinos foram classificados em quatro categorias de CCS (inferior ou igual a 250.000 células/mL), 251.000 a 400.00 células/mL, 401.000 a 600.000 células/mL e superior a 600.000 células/mL). No presente estudo não foi possível observar um padrão espacial onde se objetiva identificar aglomerados (clusters) de rebanhos dentro de uma área contínua e com características comuns em termos de CCS (Figura 11). O resultado observado para o grau de dependência espacial fraco ($GD<0,25$), somado a áreas descontínuas de rebanhos com CCS superior a 600.000 células/mL, foi determinante para a não realização da análise Bayesina para classificação dos rebanhos com base em dados probabilísticos.

Tabela 5. Distribuição de frequência do número de áreas e rebanhos de acordo com as categorias de Contagem de Células Somáticas (CCS) identificadas na análise espacial.

Categoria de CCS* (x 1.000 células/mL)	Áreas		Rebanhos	
	n	%	n	%
<250	6	25,0	7	5,7
250 – 600	3	12,5	60	48,8
> 600	15	62,5	56	45,5
Total	24	100,0	123	100,0

*CCS: contagem de células somáticas; n: número.

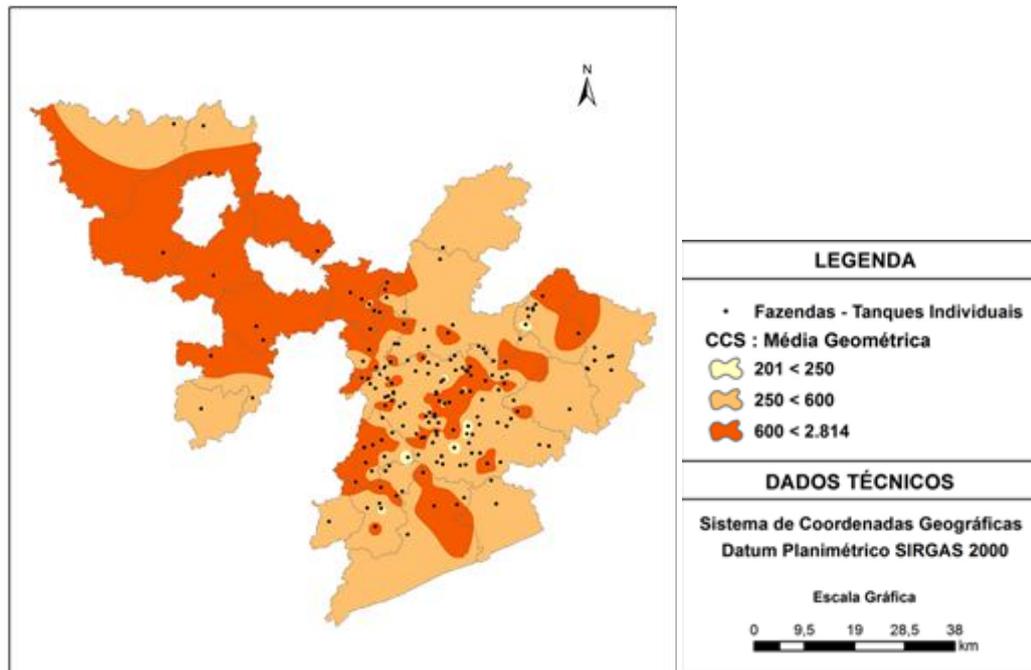


Figura 11. Variação da Contagem de Células Somáticas (CCS) de acordo com as regiões de localização dos rebanhos da Cooperativa LAC, 2015/2016.

5.2 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) DOS REBANHOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO DE PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE

Os resultados da Tabela 6 mostram que apenas 4,7% dos rebanhos apresentaram a CCS inferior ou igual a 200.000 células/mL, situação considerada de controle da sanidade da glândula mamária, faixa de CCS onde a perda de produção é considerada irrelevante (FONSECA e SANTOS, 2001; BRITO et al., 2002). No intervalo entre 200.000 e 400.000 células/mL encontram-se 18,6% dos rebanhos e 76,7% acima de 400.000 células/mL.

Rebanhos com CCS abaixo de 250.000 células/mL apresentam estimativa para gravidade de mastite baixa ou nenhuma, entre 250.000 células/mL e 500.000 células/mL gravidade média e acima de 500.000 células/mL acima da média, ruim ou muito ruim, à medida que se aumenta a contagem (BRITO et al., 2002). Dos rebanhos avaliados encontramos 76,7% que estão com CCS superior a 400.000 células/ mL, ou seja, pertencentes ao grupo de gravidade média, ruim ou muito ruim, retratando a situação preocupante da saúde da glândula do rebanho brasileiro.

Estudo realizado por Oliveira (2013) em rebanhos no estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro, encontrou resultados onde 13,6% dos rebanhos estavam com CCS menor ou igual a 250.000 células/mL, 22,8% entre 250.000 e 400.000 células/mL e 63,6% acima de 400.000 células/mL .

Tabela 6. Distribuição de frequência da contagem de células somáticas (CCS) em 43 rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata de Minas Gerais.

CCS (x1.000 células/mL)	Frequência	Porcentagem	Percentual acumulado
CCS ≤ 200	2	4,7	4,7
200 < CCS ≤ 400	8	18,6	23,3
CCS ≥ 400	33	76,7	100,0
Total	43	100,0	

CCS: contagem de células somáticas.

De acordo com a IN 7/2016 os rebanhos das regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste deverão estar com CCS máxima de 400.000 células/mL até o mês de julho de 2018. Dentre os rebanhos analisados, apenas 23,3% estariam dentro dos limites da legislação e 76,7% não atenderiam.

Estes resultados apontam o longo caminho a ser percorrido pela pecuária leiteira brasileira, pois levantamentos realizados de 2006 a 2014 em rebanhos do sudeste brasileiro mostraram que não houve redução no percentual de rebanhos com CCS acima de 400.000 células/mL neste período, variando de 53,4% a 55,5% os rebanhos que ainda permanecem acima dos limites da legislação. Ao contrário dos Estados Unidos, que possui programas de monitoramento de longa data, em 1995 27,2% dos rebanhos tinham CCS superior a 400.000 células/mL e em 2013, apenas 11,6% tinham CCS superior a 400.000 células/mL. Um dos principais motivos para alcançarem estes resultados foi a adoção de um dos principais pontos de controle de mastite contagiosa, que é a eliminação de vacas com infecção crônica nos rebanhos (RODRIGUES et al., 2017).

A situação apresentada pelos rebanhos brasileiros mostra que o controle da mastite subclínica é um desafio para o setor lácteo nacional. Existe a necessidade da implantação de programas de controle de mastite para auxiliar os produtores na redução da CCS, pois as prorrogações de prazos através da criação de novas Instruções Normativas têm mostrado pelos resultados citados anteriormente que não são a solução para melhoria da qualidade do leite no país.

5.3 ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE ENTRE REBANHOS BOVINOS LEITEIROS LOCALIZADOS NA ZONA DA MATA DE MINAS GERAIS

Do total de 43 rebanhos selecionados na amostragem, houve isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* em pelo menos uma das três amostras de leite do tanque de 40 e 35 rebanhos, respectivamente. Com base nos resultados dos exames microbiológicos, a estimativa da prevalência entre rebanhos para *S. aureus* foi de 93,0% e para *S. agalactiae* de 81,4% (Tabela 7). Observou-se sobreposição no intervalo de confiança de 95% para a prevalência de ambos patógenos, mostrando que os dois patógenos estão distribuídos homogeneamente entre os rebanhos estudados. Resultados apresentados por Brito et al. (1999) em estudo na região da Zona da Mata Mineira e Campo das Vertentes mostrou que *S. aureus* foi o patógeno primário mais frequentemente isolado, estando presente em 98% dos rebanhos e *S. agalactiae*, sendo isolado de 60% dos rebanhos. Estes resultados mostram que as medidas de controle e prevenção de patógenos contagiosos não estão sendo realizadas efetivamente nestes rebanhos de acordo com Brito et al (1999) e Oliveira (2013) e necessita com urgência a implantação de programas de controle e erradicação destes patógenos na região.

A erradicação é uma das medidas de controle para *S. agalactiae*. Na Dinamarca um programa nacional de erradicação tem sido realizado por várias décadas (KEEFE, 2012). *S. agalactiae* é o agente mais sensível à antibioticoterapia durante a lactação, podendo apresentar taxa de cura da ordem de 70 a 80%. Quando este agente se encontra infectando mais de 25% do rebanho, deve-se considerar a “blitz” terapia, que consiste no tratamento maciço de todos animais infectados durante a lactação (FONSECA e SANTOS, 2001). Um estudo realizado

na Zona da Mata de Minas Gerais mostra a redução da prevalência de *S. agalactiae* em um rebanho de 62 para 2%, no período de um ano. Os resultados do estudo mostraram a viabilidade técnica na redução da prevalência deste patógeno, entretanto houve um impacto econômico relacionado à compra dos antibióticos e a necessidade de descartar o leite de acordo com o período de eliminação de resíduos de leite. A prevalência de *S. aureus* neste rebanho também foi reduzida em torno de 20% após descarte de animais cronicamente infectados. O descarte é uma medida importante nos programas controle de *S. aureus* nos rebanhos. (MENDONÇA et al.,2018)

Tabela 7. Prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos da Zona da Mata de Minas Gerais.

Situação	N rebanhos	Positivos	Prevalência (%)	IC 95%	
				Inferior	Superior
STAPH	43	40	93,0 ^a	85,4	100,0
STRAG	43	35	81,4 ^a	69,8	93,0

^a Letras diferentes entre linhas indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

*STAPH: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; N: número; IC 95%:intervalo de confiança 95%.

5.4 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE 43 REBANHOS BOVINOS LOCALIZADOS NA ZONA DA MATA DE MINAS GERAIS DE ACORDO COM O ISOLAMENTO DOS PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE

Os resultados dos exames microbiológicos de acordo com os rebanhos mostraram três perfis epidemiológicos distintos em relação ao padrão de infecção da glândula mamária. O primeiro perfil epidemiológico, o mais desejado, não foi a ausência de ambos patógenos nas tres amostras de leite do tanque de expansão. O segundo perfil epidemiológico, considerado intermediário, foi o isolamento de *S. aureus* em pelo menos uma das três amostras de leite do tanque. O terceiro perfil

epidemiológico, considerado a pior situação sanitária, em relação à saúde da glândula mamária, foi o isolamento de ambos patógenos (Tabela 8).

5.4.1 Rebanhos sem isolamento de ambos patógenos

Dos 43 rebanhos analisados, em três (7%) não foram isolados *S. aureus* e *S. agalactiae*, situação desejada de saúde da glândula mamária. Estes rebanhos devem ter como prioridade o controle do trânsito de animais, não permitindo a entrada de animais doentes no rebanho, monitoramento da CCS do tanque e a realização de exames microbiológicos do tanque para monitoramento da presença destes patógenos, sempre que ocorrer elevação da CCS.

5.4.2 Rebanhos com isolamento de *S. aureus*

Dos 43 rebanhos analisados, cinco (11,6%) apresentaram isolamento somente de *S. aureus*. As medidas de controle irão depender da prevalência do patógeno dentro do rebanho, que deve ser conhecida através da realização da cultura microbiológica de cada animal, adoção de técnicas de manejo de ordenha adequadas, realização da terapia de vaca seca e a segregação e /ou o descarte de animais infectados.

5.4.3. Rebanhos com isolamento de ambos patógenos

Dos 43 rebanhos analisados, 35 (81%) apresentaram isolamento de ambos patógenos, mostrando que estes estão presentes na maioria dos rebanhos estudados na região. Neste estudo, não foi encontrado nenhum rebanho com isolamento somente de *S. agalactiae*.

O desenvolvimento de um programa adequado de controle de mastite deve levar em consideração dois pontos fundamentais: a prevenção de novos casos de mastite (clínica e subclínica) e a redução da duração das infecções já existentes (NEAVE et al., 1966). Para que se realize um programa de prevenção e controle de mastite na propriedade, é recomendado, a adoção de procedimentos de higiene no momento da ordenha; instalação correta e manutenção periódica dos equipamentos de ordenha; higienização de equipamentos e dos tetos ; manejo do animal no

período seco, com ênfase no tratamento de todos os quartos no final da lactação; boa nutrição para manter a imunidade das vacas contra as infecções no período seco, principalmente no pré-parto, ordenhar as vacas infectadas por último, terapia apropriada da mastite durante a lactação e descarte de vacas com infecção crônica (TOZZETTI et al., 2008).

Para patógenos contagiosos como *S. aureus* e *S. agalactiae*, o risco de incidência depende da prevalência de vacas infectadas no rebanho. Portanto faz-se necessário, a realização de cultivos microbiológicos individuais para conhecimento da prevalência entre indivíduos em um rebanho, para planejamento do tratamento visando a erradicação. A redução da prevalência pode ser através do tratamento dos casos clínicos, tratamento dos animais no final da lactação ou descarte de animais. O objetivo do tratamento para *S. agalactiae* é geralmente a erradicação do patógeno do rebanho e para *S. aureus* é potencialmente curar casos individuais e reduzir o grupo de vacas infectadas dentro do rebanho. A taxa de cura das infecções por *S. aureus* são muito inferiores às das infecções por *S. agalactiae*, por isso o descarte de animais infectados por *S. aureus* é recomendado (KEEFE, 2012).

Tabela 8. Distribuição de frequência de 43 rebanhos bovinos localizados da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais de acordo com os resultados dos exames microbiológicos.

Resultados do exame microbiológico	N rebanhos	Positivos	Frequência (%)	IC 95%	
				Inferior	Superior
Sem isolamento	43	3	7,0 ^a	0,0	14,6
STAPH	43	5	11,6 ^a	2,0	21,2
STAPH+STRAG	43	35	81,4 ^b	69,8	93,0

^a Letras diferentes entre linhas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

*STAPH: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; N: número; IC 95%: intervalo de confiança 95%.

5.5 RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CELULAS SOMÁTICAS DO REBANHO DE ACORDO COM OS RESULTADOS DOS EXAMES MICROBIOLÓGICOS

Dos rebanhos em que não houve isolamento de ambos patógenos, a média de CCS foi de 224.000 células/mL. Este valor médio de CCS reflete uma situação sanitária desejada e que atende aos requisitos na IN 7/2016. Para rebanhos com isolamento somente para *S. aureus* a média de CCS foi de 447.000 células/mL e para rebanhos com isolamento de ambos os patógenos, a média foi 794.000 células/mL (Tabela 9). Não foi observada diferença estatística entre as médias do log₁₀CCS ($P > 0,05$) dos rebanhos sem isolamento e somente com isolamento de *S. aureus*. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) para CCS entre os rebanhos sem isolamento de ambos patógenos e com isolamento somente para *S. aureus* em relação aos rebanhos com isolamento para ambos os patógenos. Rebanhos que possuem o agente *S. agalactiae* associado a *S. aureus* apresentaram, em média, a CCS mais elevada, o que sugere que estes rebanhos dificilmente conseguirão se enquadrar dentro do limite de 400.000 células/mL estabelecidos na legislação (OLIVEIRA, 2013). Ambos os microrganismos causam infecções persistentes e são tipicamente subclínicas. CCS acima de 1.000.000 células/mL não são incomuns nas infecções por *S. agalactiae*, enquanto nas infecções por *S. aureus* a CCS é mais moderada (KEEFE, 2012). Em uma metanálise Djabri et al. (2002) encontraram média geométrica de 357.000 e 857.000 por quarto mamário infectado por *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente.

Tabela 9. Médias de contagem de células somáticas (CCS) de 43 rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais de acordo com a presença dos patógenos contagiosos da mastite *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Resultado do exame microbiológico	N	Média log ₁₀ CCS	Desvio Padrão	CCS (x 1.000 células/mL)
Sem isolamento	3	2,35 ^a	0,15	224 ^a
STAPH	5	2,65 ^a	0,23	447 ^a
STAPH + STRAG	35	2,90 ^b	0,31	794 ^b

^a Letras diferentes entre linhas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). STAPH: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; N: número de rebanhos; CCS: contagem de células somáticas.

Através do teste qui-quadrado, quando comparamos os dados da distribuição de frequência de rebanhos de acordo com os resultados dos exames microbiológicos com a contagem de células somáticas do rebanho, considerando o limite de 400.000 células/mL, os rebanhos sem isolamento ou somente com *S. aureus* estão associados à CCS inferior a 400.000 células/mL. Rebanhos com isolamento de ambos patógenos estão associados à CCS superior a 400.000 células/mL. Todos os três rebanhos que não apresentaram isolamento no exame microbiológico apresentaram a CCS inferior a 400.000 células/mL. Entre os rebanhos que apresentaram isolamento de ambos patógenos, 83,3% destes rebanhos apresentaram CCS superior a 400.000 células/mL. De forma intermediária, rebanhos com isolamento somente de *S. aureus*, 60,0% apresentaram CCS superior a 400.000 células/mL. Os resultados indicam que a presença de *S. agalactiae* foi determinante para que a CCS fosse superior a 400.000 células/mL (Tabela 11).

Tabela 10. Atendimento à IN 7 de 2016 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para 2018, de acordo com os patógenos isolados de 43 rebanhos bovinos leiteiros da Zona da Mata Minas Gerais.

Resultado de exame microbiológico	CCS ≤ 400		CCS > 400	
	N	%	N	%
Sem isolamento	3	100,0 ^a	0	0,0 ^a
STAPH	2	40,0 ^a	3	60,0 ^{ab}
STAPH +STRAG	5	14,3 ^b	30	85,7 ^b

^a Letras diferentes entre linhas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

*STAPH: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; N: número de rebanhos; CCS: contagem de células somáticas.

A área sob a Curva ROC (Figura 12) foi estatisticamente significativa ($P < 0,01$), alcançando uma área de 0,811 (81,1%). A área sob a curva ROC constitui um índice para sumarizar a qualidade da curva e é uma medida de desempenho de um teste (Dohoo et al., 2003). Testes totalmente incapazes de discriminar indivíduos ou rebanhos infectados e não infectados, teriam uma área sob a curva menor ou igual a 0,5 (50%). Acima de 0,7 é considerado como desempenho satisfatório. Desta forma, a utilização da CCS do rebanho em uma população de rebanhos onde a prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* é conhecida permite identificar rebanhos infectados por ambos patógenos com desempenho satisfatório. Entretanto, é necessário definir um ponto de corte para a CCS do rebanho (Tabela 11), de forma que este rebanho seja classificado como infectado ou não por ambos patógenos e estimar a sensibilidade e especificidade deste ponto de corte. Considerando o ponto de corte 263.000 células/mL, foi observado uma sensibilidade de 97,1% e especificidade de 37,5%. Assim, aproximadamente 97% de todos os rebanhos com CCS superior ou igual a 263.000 células/mL seriam classificados corretamente para a presença de ambos os patógenos. Entretanto, rebanhos com CCS inferior a 263.000 células/mL apresentaram a probabilidade de 37% de serem corretamente classificados como rebanhos com a presença de nenhum patógeno ou somente *S. aureus*.

Geralmente, para facilitar a identificação do melhor ponto de corte, é necessário elaborar um gráfico de linhas com a variação da sensibilidade e da especificidade. Observar no eixo X o valor relativo ao ponto formado pela linha da sensibilidade e especificidade (Figura 13). No caso dos rebanhos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais, o valor entre 502.000 células/mL e 511.000 células/mL gerou uma sensibilidade de aproximadamente 71% e especificidade de 75%. Assim, aproximadamente 71% de todos os rebanhos com CCS superior ou igual a 511.000 células/mL seriam classificados corretamente para a presença de ambos os patógenos. Entretanto, rebanhos com CCS inferior a 511.000 células/mL apresentaram a probabilidade de 75% de serem corretamente classificados como rebanhos infectados somente por *S. aureus* ou sem a presença de ambos patógenos. A utilização da curva ROC para dados de CCS de rebanhos associado ao estudo de prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* permitiu classificar rebanhos com base em dados probabilísticos para a presença dos patógenos estudados. Com

base nos resultados das estimativas de sensibilidade e especificidade em função da CCS, os rebanhos foram classificados em três níveis conforme a seguir. O primeiro nível considerado risco baixo, com CCS abaixo de 250.000 células/mL. O segundo nível considerado como de risco médio, com sensibilidade entre 97% e 75%, rebanhos com CCS entre 250.000 e 500.000 células/mL. O terceiro nível, considerado risco alto, rebanhos com sensibilidade maior ou igual a 75% e com CCS acima de 500.000 células/mL. A estratégia de classificação dos rebanhos com base em dados de CCS e a sensibilidade e a especificidade de isolamento de patógenos contagiosos da mastite gerados a partir da curva ROC, não permite usar os resultados de uma população de bovinos em outra. Para tal, é necessário conhecer a situação sanitária dos rebanhos em relação à prevalência dos patógenos contagiosos da mastite e como a CCS se comporta.

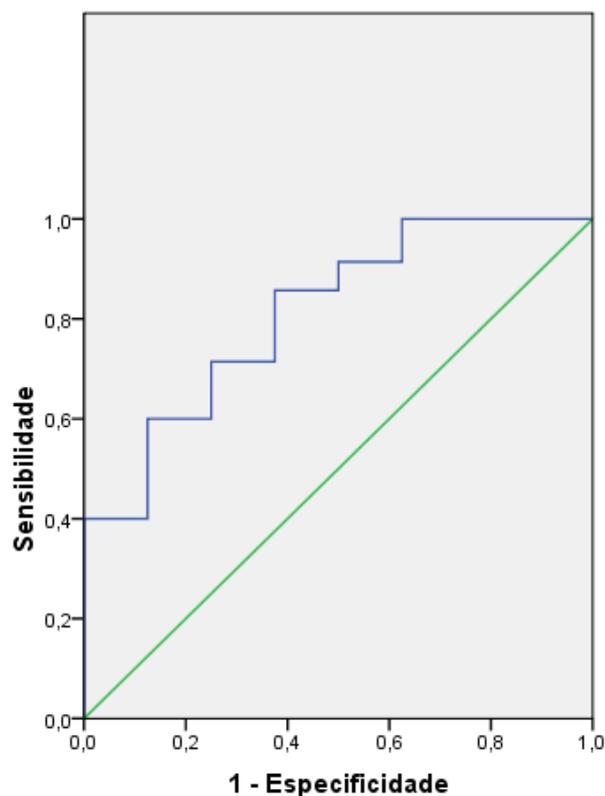


Figura 12. Área sob a curva (Curva ROC) para estimar a probabilidade de presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/2017.

Tabela 11. Variação da sensibilidade e especificidade com base na contagem de células somáticas (CCS) do rebanho para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/2017

CCS (x1.000 células/mL)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Risco
166	100,0	0,0	Baixo
184	100,0	12,5	Baixo
203	100,0	25,0	Baixo
230	100,0	37,5	Baixo
263	97,1	37,5	Médio
284	94,3	37,5	Médio
311	91,4	37,5	Médio
331	91,4	50,0	Médio
339	88,6	50,0	Médio
348	85,7	50,0	Médio
398	85,7	62,5	Médio
450	82,9	62,5	Médio
475	80,0	62,5	Médio
493	77,1	62,5	Médio
495	74,3	62,5	Médio
502	71,4	62,5	Alto
511	71,4	75,0	Alto
517	68,6	75,0	Alto
528	65,7	75,0	Alto
544	62,9	75,0	Alto
565	60,0	75,0	Alto
589	60,0	87,5	Alto
601	57,1	87,5	Alto
605	54,3	87,5	Alto
627	51,4	87,5	Alto
665	48,6	87,5	Alto
722	45,7	87,5	Alto
788	42,9	87,5	Alto
822	40,0	87,5	Alto
845	40,0	100,0	Alto

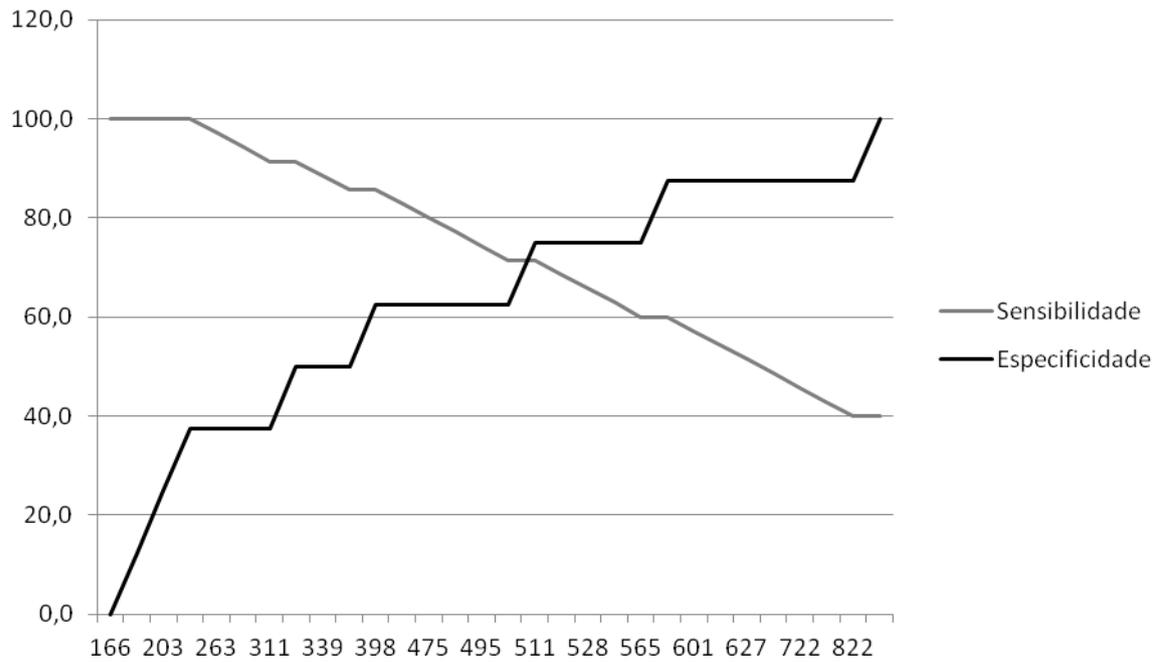


Figura 13. Variação da sensibilidade e especificidade com base na contagem de células somáticas (CCS) do rebanho para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em 43 rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, 2016/2017.

6 CONCLUSÃO

A prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* entre rebanhos foi considerada alta para ambos os patógenos, indicando que as medidas de controle para estes patógenos não estão sendo realizadas de maneira eficiente. Não foi observada diferença entre as prevalências de *S. aureus* e *S. agalactiae* entre os rebanhos. Foi observada uma associação entre a CCS dos rebanhos e a presença de ambos patógenos, permitindo desta forma uma classificação dos rebanhos com base em dados probabilísticos em risco baixo, médio e alto. Os resultados encontrados no presente estudo não permitem ser extrapolados para outra população de rebanhos devido à situação sanitária particular de cada grupo ou população de rebanhos. Entretanto, a metodologia pode ser usada em outras populações de rebanhos para estimar o risco da presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* com base em dados probabilísticos gerados a partir da CCS e estudos de prevalências para estes patógenos.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSEN, H. J.; PEDERSEN, L. H.; AARESTRUP, F. M.; CHRIÉ, M. Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1233-1239, 2003.

BARBOSA, S. B. P.; BATISTA, A. M. V.; MONARDES, H. **Leite: segurança alimentar e saúde pública**. Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008.

BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HANCOCK, D. D.; HEIDER, L. E. Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1715-1721, 1992.

BECK, H. S.; WISE, W.S.; DODD, F.H. Costs benefit analysis of bovine mastitis in the UK. **Journal of Dairy Research**, v.59, n. 4, p.449-460, 1992.

BENNET, R.M.; CHRISTIANSEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v.66, n. 3, p.455-459, 1999.

BOTARO, B. G.; GAMEIRO, A. H.; SANTOS, M. V. Effect of payment system on quality of milk in Brazilian Dairy Herds. In: 50TH NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING,1, 2011, Arlington, **Anais...Verona**: Ed. National Mastitis Council, 2011. p. 147-148.

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

BRAMLEY, A. J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control – progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v. 51, n.3, p. 481-512, 1984.

BRAMLEY, A. J. Mastitis. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine: Diseases and husbandry of Cattle**. Oxford: Ed. Blackwell Scientific Publications, 1992. p.289-300.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 37, de 18 de abril de 2002. Instituir a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com o objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 19 abr. 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 18 set. 2002b. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 29 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 07, de 03 de maio de 2016. Dispõe sobre alteração do Art. 1º a tabela 2 o item 3.1.3.1 do Anexo II da Instrução Normativa nº 62 que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 04 maio 2016. Seção 1, p. 11.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n.1, p. 39-44, 1998.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITO, J. R. F. Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16 p. **Embrapa Gado de Leite**. Circular Técnica, 62.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Como reconhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8 p. **Embrapa Gado de Leite**. Circular Técnica, 70.

CARDOSO, M. **Percepção das empresas de lácteos sobre programas de pagamento por qualidade do leite e evolução dos indicadores de qualidade higiênico-sanitários**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

CONRAD, L. F. **Mastite bovina por *Staphylococcus aureus***: Revisão Bibliográfica. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CRUZ, J. C. M.; MOLINA, L. R.; BRITO, J. R. F.; CUNHA, R. P. L.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N. Eficiência da blitz terapia na erradicação de *Streptococcus agalactiae* e controle de *Staphylococcus aureus* em rebanhos bovinos leiteiros. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. UPF, Passo Fundo: Ed. UPF, 2004. p. 331.

DEKKERS, J.C.; VAN ERP, T.; SCHUKKEN, Y.H. Economic benefits of reducing somatic cell count under the milk quality program of Ontario. **Journal of dairy Science**, v. 79, n. 3, p.396-401, 1996.

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

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiology Research**. 1. ed. Prince Edward Island: National Library of Canada Cataloguing in Publication, 2003, 706p.

DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, 2004.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. In: VAN HORN, H.H.; WILCOX, C.J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p.440-447.

ESRI – Data and Maps. ArcGIS [CD-ROM] Versão 9.1. Redlands, CA **Environmental Systems Research Institute Inc.**, 2005.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, p. 1315-1320, 2004.

FONSECA, L. F. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e Controle de Mastite**. 2. ed. São Paulo: Lemos, 2001.

GAY, E.; BARNOUIN, J.; SENOUSI, R. Spatial and temporal patterns of herd somatic cell score in France. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.7, p.2487-2498, 2006.

GAY, E.; SENOUSI, R.; BARNOUIN, J. A spatial hazard model for cluster detection on continuous indicators of disease: application to somatic cell score. **Veterinary Research**, v.38, n.4, p.585-596, 2007.

HAIR JÚNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

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

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2113, 1994.

HALL, D. C.; EHUI, S. K.; SAHPIRO, B. I. Economic analysis of the impact of adopting herd health control programs on smallholder dairy farms in Central Thailand. **Agricultural Economics**, v.31, p.335-342, 2004.

HOMAN, E. J.; WATTIAUX, M. A. **Technical Dairy Guide: Lactation and Milking**: Universidade de Wisconsin-Madison, Madison: Babcock Institute for International Dairy Research and Development/ University of Wisconsin. p. 93-96. Disponível em: <<http://babcock.wisc.edu/node/120>>. Acesso em: 20 jan.2018.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk**. Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-eletronic counters. Brussels: IDF, 2006. 13p. (IDF Standard 148-2).

KATHOLM, J.; RATTENBORG, E. The surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds 1989-2008 In: 5th. IDF MASTITIS CONFERENCE, 2010. Christchurch, New Zealand, 2010 p. 241-246.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 7, p. 429-435, 1997.

KEFFE, G.P. Update on control of *staphylococcus aureus* and *streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.28, n.2, p. 203–216, 2012.

LEBLANC, S. J., LISSEMORE, K. D., KELTON, D. F., DUFFIELD, T. F., LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.89, n.4, p.1267-1279, 2006.

CASSOLI, L. D.; SILVA, J.; MACHADO, P. F. et al. **Mapa da Qualidade-Contagem De Células Somáticas (CCS)**.1. ed. Piracicaba: Clínica do leite-ESALQ/USP, 2016.

MARTINS, P. C.; YAMAGUCHI, L. C. T.; ARCURI, P. B.; ARCURI, E. F. Pagamento por qualidade no Brasil: motivações e obstáculos. In: FACCINI, J. L.H.; CARVALHO, M. P.; SANTOS V. M. (Org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004, p. 87-104.

MENDONÇA, F. M. J.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; SILVA, M. R.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; SOUZA, G. N. Prevalence reduction of contagious mastitis pathogens in a Holstein Dairy Herd under Tropical Conditions. **Journal Veterinary Science & Technology**, v.9, n.1,2108.

MESQUITA, A. J., DÜRR, J. W., COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006.

NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G. A method on controlling udder disease. **Veterinary Record**, v. 78, n. 15, p. 521–522, 1966.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: NMC,1996.

OLIVEIRA, E. F. **Relação entre análise espacial da contagem de células somáticas e prevalência de patógenos contagiosos em rebanhos leiteiros**. 2013.Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

OLIVEIRA, E. F.; BRITO, M. A. V.; LANGE, C. C.; HYLARIO, S. M.; BRUNO, A. F.; SILVA, M. R.; SOUZA, G. N. Estimative of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* prevalence among dairy herds from Minas Gerais Holstein Dairy Association, Brazil, 2011/2012. In: 52TH NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 2013, San Diego, **Anais..** San Diego: Ed National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 2013 p. 209-210.

OSTERAS, O.; HOGEBEEN, H.; SINGH, D. K.; LESLIE, D. K. Economic consequences of mastitis. **Bulletin of the International Dairy Federation**, 394/2005. IDF, Bruxelles, Belgium. 2005.

PETRIE, A.; WATSON, P. **Estatística em ciência animal e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2009.

PFEIFFER, D. **Veterinary Epidemiology: an introduction**. John Wiley & Sons, 2010.

PYÖRÄLÄ, S. Mastitis caused by different microbes. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995. p. 143-160.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; **Microbial Disease**. Oxford: Blackwell, 2002. p. 465-475.

RADOSTITIS, O. M.; LESLIE, K.E.; FETROW, J. **Herd health: Food Animal Production Medicine**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1994.

REHAGRO. Qualidade do leite e controle de mastite: *Staphylococcus aureus*.2017. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/qualidade-do-leite-e-controle-de-mastite-staphylococcus-aureus-2/>>. Acesso em: 18 jan.2018.

RODRIGUES, L. G.; AQUINO, M. H. C.; SILVA, M. R.; MENDONÇA, L. C.; MENDONÇA, J. F. M.; SOUZA, G. N. A time series analysis of bulk tank somatic cell counts of dairy herds located in Brazil and the United States. **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, 2017.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v.34, n.4, p.579-596, 2003.

SERGEANT, E. S. G. **Epitools epidemiological calculators**. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. 2014. Available at: < <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>>. Acesso em: 22 maio 2016.

SILVA, R. O. P. Instrução Normativa n. 62: uma decisão consciente para o setor lácteo. **Análises e indicadores do agronegócio**, v.7, n.2, p.1-3, 2012.

SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2006.

SOUZA, G. N., BRITO, J. R. F., MOREIRA, E. C., BRITO, M. A. V. P., SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1015-1020, 2009.

SOUZA, G. N., BRITO, M. A. V. P., LANGE, C.C., BRANDÃO, H. M., MENDONÇA, L. C., BRITO, J. R. F 2010. Presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* nos rebanhos bovinos e os limites de contagem de células somáticas e contagem total de bactérias estabelecidos na instrução normativa 51. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** CD ROM.

SOUZA, G.N., CARVALHO, G.L.O., GREGO, C.R., HOTT M.C., SILVA, M.R., BRUNO, A.F., OZÓRIO, R.S., HYLARIO, S.M., ENCARNAÇÃO, M.H. & OLIVEIRA, E.F. Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite. In: ENCONTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA VETERINÁRIA, 1, 2012. Porto Alegre. **Resumos...**Porto Alegre: Acta Scientiae Veterinariae, 2012. 40 (Supl 2): s78. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/40-suple-2/1%20ENEPI%20.pdf>> acesso em: 18 jan.2018.

SOUZA, G. N.; CARVALHO, G. L. O.; GREGO, C. R.; HOTT, M. C.; SILVA, M. R.; HILARIO, S. M.; AMARAL, C. M.; REIS, R. A. Análise espacial dos indicadores de qualidade higiênico-sanitária do leite de rebanhos bovinos localizados nas bacias leiteiras de Jaru e Ji-Paraná, Rondônia, 2011. In: XI CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2012, Goiânia. **Anais** do XI Congresso Internacional do Leite, 2012b.

STÄRK, K. D. C.; REGULA, G.; HERNANDEZ, J.; KNOPF, L.; FUCHS, K.; MORRIS, R. S.; DAVIES, P. Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary public health: Review of current approaches. **BMC Health Services Research**, v.6, n.20, 2006.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. São Paulo, v.6, n.10, jan 2008. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YFbjMNRGCotOL73_2013-5-28-15-25-40.pdf>. Acesso em: 18 jan.2018.

TRANGMAR, B. B.; YOST, R. S.; UEHARA, G. Applications of geostatistics to spatial studies of soil properties. **Advances in Agronomy**, v.38, p.45-94, 1985.

UDDER Topics. Verona, WI: **National Mastitis Council**, v.32, n.2, may-jun. 2009. 6p.

USDA-APHIS. Prevalence of Contagious Mastitis Pathogens on U.S. Dairy Operations, 2007. **APHIS Veterinary Service Info Sheet**. n.533.1008. Fort Collins, CO: APHIS, USDA; 2008. Disponível em:<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy_monitoring/BTSCC_2011infosheet.pdf>. Acesso em : 18 jan.2018.

VIEIRA, S. R. Uso da geoestatística em estudos de variabilidade espacial de propriedades do solo. In: NOVAIS, R. F. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo 1**. Viçosa: Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 3-87.

ZIMBACK, C. R. L. **Análise espacial de atributos químicos de solo para o mapeamento da fertilidade do solo**. 2001. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas) -Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2001.