

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROPOSTA DE UM PROGRAMA DE QUALIDADE DO LEITE E
CONTROLE DA MASTITE EM REBANHO BOVINO DE VACAS
HOLANDESAS

GUIDO GOMES WANDERLEY

Botucatu – SP, Abril de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROPOSTA DE UM PROGRAMA DE QUALIDADE DO LEITE E
CONTROLE DA MASTITE EM REBANHO BOVINO DE VACAS
HOLANDESAS

GUIDO GOMES WANDERLEY

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
de título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

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

Wanderley, Guido Gomes.

Proposta de um programa de qualidade do leite e controle
de mastite em rebanho bovino de vacas Holandesas
/ Guido Gomes Wanderley. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Epidemiologia veterinária. 2. Mastite - Fatores
de risco. 3. Bovino de leite - Doenças. 4. Leite -
Qualidade.

Palavras-chave: Epidemiologia; Fatores de risco;
Mastite bovina; Qualidade do leite.

Nome do Autor: Guido Gomes Wanderley

Título: PROPOSTA DE UM PROGRAMA DE QUALIDADE DO LEITE E
CONTROLE DA MASTITE EM REBANHO BOVINO DE VACAS
HOLANDESAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu – São Paulo

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu – São Paulo

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos
Membro
Departamento de Nutrição e Produção Animal
FMVZ – USP – Pirassununga – São Paulo

Data da Defesa: 24 de abril de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às duas pessoas mais importantes da minha vida: Helena, minha mãe e meu exemplo de vida e à Clarissa a minha inspiração para nunca desistir dos meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Em tudo devemos eternos agradecimentos ao Criador de todas as coisas, Deus. Só com Ele somos capazes de superar os obstáculos com dignidade e afinco.

Aos meus familiares que sempre estiveram ao meu lado, em especial a minha mãe, Helena, que sempre foi um exemplo de perseverança e quem me ensinou todos os valores da vida. Às minhas irmãs Manoela e Laura pelos momentos de força e carinho. Ao meu pai *in memoriam* que tenho imenso orgulho de carregar o seu nome e que foi o responsável pelos meus primeiros passos na leitura e na importância de se estudar sempre.

À minha amada e futura esposa, Clarissa, principalmente pela paciência imensa em partilhar da distância, muitas vezes dolorosa, estressante e angustiante. Por muitas vezes foi quem me deu forças e paz para seguir buscando os meus ideais.

Aos amigos Edward, o Bolifa, pela convivência nestes últimos três anos e à Daniela Barbosa, contemporânea de residência por sempre estar presente nos momentos bons e ruins.

Ao meu orientador e exemplo de docente, prof. Helio Langoni, pela oportunidade e paciência em dividir o conhecimento e estar sempre acessível às minhas inacabáveis dúvidas.

Aos pós-graduandos do NUPEMAS por muitas vezes se prontificarem em ir às coletas e me ajudar com todo o processamento dos dados.

Ao prof. Pantoja por participar do delineamento experimental e pelos ensinamentos.

Às professoras Luzia Trinca e Cláudia Pio pelo imenso e dedicado trabalho nas análises estatísticas, sem elas jamais conseguiria finalizar as etapas.

À FAPESP por acreditar no trabalho em financiar a bolsa de mestrado processo 2013/24973-5.

Ao Jorge, proprietário da fazenda, por abrir as portas e permitir a concretização deste trabalho. E todos os funcionários da propriedade que sempre foram atenciosos e dispostos a nos ajudarem, com eles aprendi muita coisa que não se aprende na universidade, mas na vivência do dia a dia de uma fazenda.

Aos meus professores de graduação, da UFRPE, por terem contribuído para a minha formação profissional.

E aos funcionários do DHVSP por sempre estarem dispostos, principalmente a ouvir nossas queixas e nos ajudar quando mais precisamos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos parâmetros do modelo matemático para infecção de mastite subclínica por <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas.	32
Tabela 2 -	Tempo (mês), o total do número de quartos mamários (N), o número de quartos mamários em cada compartimento (infectado, cronicamente infectado, recuperados, susceptíveis) e o número de chegada de indivíduos em cada um destes compartimentos ($\phi_1 + \phi_4$, $\phi_2 + \phi_3$). Botucatu, São Paulo, 2015.....	33
Tabela 3 -	Tempo (mês) e parâmetros (%) estimados dos dados obtidos no presente estudo. Botucatu, 2015.....	34
Tabela 4 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto que foram estatisticamente significativos para mastite subclínica em relação ao número de lactações de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	43
Tabela 5 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto que foram estatisticamente significativos para mastite subclínica em relação aos dias em lactação de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	45
Tabela 6 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite subclínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	48
Tabela 7 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre mastite subclínica com base nos parâmetros de mastite clínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	51
Tabela 8 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite clínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	61
Tabela 9 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre mastite clínica com base nos parâmetros de mastite subclínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	63
Tabela 10 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre o insucesso no tratamento antimicrobiano de mastite	

	clínica em vacas Holandesas e as variáveis observadas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	65
Tabela 11 -	Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para o insucesso no tratamento da mastite clínica com base no micro-organismo isolado e a ordem do caso de mastite clínica de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	68
Tabela 12 -	Parâmetros estimados pelo algoritmo genético da modelagem para a infecção subclínica causada pelo <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	69
Tabela 13 -	Análise de sensibilidade do modelo matemático para a infecção subclínica causada por <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	71
Tabela 14 -	Análise de sensibilidade do modelo matemático para a infecção subclínica causada por <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plano de trabalho em três fases para a efetiva realização do programa de controle de mastite em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo 2015.....	8
Figura 2 -	Diagrama mostrando os diferentes tipos de compartimentos considerados no modelo matemático para a infecção subclínica causada por <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas e o fluxo de indivíduos. Botucatu, São Paulo, 2015.....	31
Figura 3 -	Distribuição de frequência de vacas analisadas por mês no presente estudo Botucatu, São Paulo, 2015.	37
Figura 4 -	Conformação do rebanho em relação ao número de lactações de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	37
Figura 5 -	Conformação do rebanho em relação à média de dias em lactação de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	38
Figura 6 -	Média de produção individual de leite de vaca Holandesa. Botucatu, São Paulo, 2015.....	38
Figura 7 -	Contagem de células somáticas do tanque de expansão de leite de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.	39
Figura 8 -	Prevalência de mastite subclínica no rebanho de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.	40
Figura 9 -	Status de infecção da mastite subclínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.	41

Figura 10 -	Incidência real e aparente do rebanho de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.	42
Figura 11 -	Prevalência de mastite subclínica em relação ao número de lactações de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite Botucatu, São Paulo, 2015.....	42
Figura 12 -	Prevalência de mastite subclínica proporcional aos dias em lactação de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	44
Figura 13 -	Perfil de patógenos isolados de mastite subclínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015. Coryne = <i>Corynebacterium</i> spp.; staph = <i>Staphylococcus</i> spp.; strep = <i>Streptococcus</i> spp.....	47
Figura 14 -	Incidência e prevalência de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite durante o período do estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.....	52
Figura 15 -	Distribuição do total de 704 casos de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	53
Figura 16 -	Resultado do tratamento de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite ao longo do estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.....	53
Figura 17 -	Distribuição de casos de insucesso no tratamento da mastite clínica de acordo com a ordem de ocorrência dos casos de mastite clínica	

	de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	54
Figura 18 -	Insucesso no tratamento de mastite clínica em relação ao grau severidade do caso de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.	55
Figura 19 -	Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica em vacas Holandesas em relação ao resultado do cultivo microbiológico. Botucatu, São Paulo, 2015.	56
Figura 20 -	Relação entre a severidade de casos de mastite clínica em vacas Holandesas e o resultado do cultivo microbiológico. Botucatu, São Paulo, 2015.....	57
Figura 21 -	Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica de vacas Holandesas em relação ao medicamento utilizado. Botucatu, São Paulo, 2015.....	58
Figura 22 -	Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica em relação ao tipo de tratamento em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	59
Figura 23 -	Frequência do resultado do cultivo microbiológico de casos de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	59
Figura 24 -	Relação entre os dias em lactação e a frequência de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	60

Figura 25 -	Relação entre o número de lactações e a frequência de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.....	60
Figura 26 -	Evolução temporal das populações de quartos mamários infectados com <i>Corynebacterim</i> spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	71
Figura 27 -	Dependência do resíduo com cada um dos parâmetros obtidos pelo processo de otimização do modelo matemático para a infecção subclínica por <i>Corynebacterium</i> spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	72
Figura 28 -	Incidência e prevalência da infecção subclínica causada pelo <i>Corynebacterium</i> spp. baseado nos dados coletados e na modelo matemático para doença em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.....	73

ABREVIACÕES

BHI = brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)
°C = Celsius
CBT = Contagem Bacteriana Total
CCS = Contagem de células somáticas
CMT = California Mastitis Test
DIM = dias em lactação
EP = erro padrão
EPM = Escola Paulista de Medicina
ESALQ = Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
EUA = Estados Unidos da América
FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Histórico de MS = histórico de mastite subclínica
IC = intervalo de confiança
IIM = Infecção intramamária
IN51 = Instrução Normativa número 51
IN62 = Instrução Normativa número 62
MC = Mastite Clínica
Mercosul = Mercado Comun do Sul
mg = miligrama
MILi = motilidade, indol e lisina
mL = mililitro
MS = mastite subclínica
N. lactação = número de lactações
NaCl = Cloreto de sódio
NMC = National Mastitis Council (Conselho Nacional de Mastite dos Estados Unidos)
NUPEMAS = Núcleo de Pesquisas em Mastite
p = valor-p
P. diária = produção diária
RC = razão das chances
SIR = susceptíveis, infectados e recuperados
UFC = Unidade Formadora de colônia
UNESP = Universidade Estadual Paulista
US\$ = Dólar americano
USDA = United State of Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
USP = Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 O cenário do controle de qualidade do leite	7
2.2 Importância do programa de controle de mastite no cenário brasileiro	8
2.3 Definição de mastite bovina	12
2.4 Mastite clínica e subclínica	13
2.5 Micro-organismos causadores de mastite bovina	14
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo Geral	8
3.2 Objetivos Específicos	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 Delineamento experimental	8
4.2 Unidade produtiva de leite	18
4.3 Plano do estudo	19
4.4 Detalhamentos dos progressos realizados	19
4.4.1 Análise preliminar de dados e formação da equipe de qualidade do leite	19
4.4.2 Visita de exploração	20
4.4.3 Durante a ordenha	20
4.5 Coleta de amostras de leite	21
4.5.1 Monitoramento da mastite subclínica	21
4.5.2 Monitoramento da mastite clínica – registro de mastite clínica	21
4.5.3 Cultivo microbiano	22
4.5.4 Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4.5.5 Identificação de <i>Streptococcus</i> spp.	23
4.5.6 Identificação de enterobactérias	24
4.5.7 Identificação de <i>Corynebacterium</i> spp.	25

4.5.8 Outros patógenos isolados	25
4.6 Diagnóstico e processamento das informações: diagnóstico	25
4.7 Elaboração do programa de controle da qualidade do leite: intervenção	25
4.8 Ações indicadas na fase de intervenção	26
4.8.1 Tratamento de mastite clínica	26
4.8.2 Tratamento de mastite subclínica	26
4.8.3 Descarte de animais	27
4.8.4 Pré e pós-dipping	27
4.8.5 Linha de ordenha	27
4.8.6 Acompanhamento do plano de controle da qualidade do leite	28
4.9 Análise estatística	28
4.10 Modelagem matemática para a infecção subclínica causada por <i>Corynebacterium</i> spp.	30
4.10.1 Análise de estabilidade da solução livre da dinâmica da infecção por <i>Corynebacterium</i> spp.	34
5. RESULTADOS	37
5.1 Características do rebanho	37
5.2 Mastite subclínica	39
5.2.1 Análise descritiva	39
5.2.2 Análise estatística para mastite subclínica	48
5.3 Mastite Clínica e tratamento antimicrobiano	52
5.3.1 Análise descritiva	52
5.3.2 Análise estatística	61
5.4 Modelagem matemática para a infecção subclínica causada pelo <i>Corynebacterium</i> spp.	69
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9. TRABALHO CIENTÍFICO	90

WANDERLEY, G.G. **Proposta de um Programa de Qualidade do Leite e Controle da Mastite em Rebanho Bovino de Vacas Holandesas**. Botucatu, 2015. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A mastite é a afecção que mais onera o setor leiteiro mundial, sendo ainda importante entrave para melhoria da produção. O objetivo deste estudo epidemiológico prospectivo foi desenvolver um plano de controle de mastite em um rebanho de vacas Holandesas. A propriedade foi visitada durante 18 meses para colheita de dados e instituição do plano de controle. Os primeiros quatro meses corresponderam à fase de diagnóstico, seguida de uma fase de intervenção perfazendo 14 meses. O plano de controle reduziu de 53,7% para 23,3% a mastite subclínica. A contagem de células somáticas do tanque reduziu de 1446×10^3 células/mL para 214×10^3 células/mL. A prevalência de mastite clínica foi 11,11% e a incidência média foi de 7,6%. Do total de 704 casos, 30,1% (217/704) não puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica, por não haver amostras pós-tratamento, 51,3% (249/485) curaram, 49,7% (236/485) falharam e repetiram o mesmo patógeno ou falharam com isolamento de um novo patógeno. Do total de 485 casos que puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica 71,9% (349/485), 19% (92/485), 7,4% (36/485) e 1,6% (8/485) eram, respectivamente, referentes aos primeiros, segundos, terceiros e quartos casos de mastite clínica na mesma glândula mamária. Houve falha no tratamento em 53,65% (44/82), 47,5% (165/347) e 48,21% 27/56, severidade um, dois e três, respectivamente. O plano de controle de mastite foi eficiente em reduzir a prevalência de mastite subclínica e elucidar os índices de mastite clínica, através de medidas simples de manejo e embasada no adequado diagnóstico epidemiológico.

Palavras-chave: mastite bovina, qualidade do leite, epidemiologia, fatores de risco.

WANDERLEY, G.G. **Proposal for a Quality Milk Program and Control of Mastitis in Holsteins Cows Cattle Herd.** Botucatu, 2015. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Mastitis is a disease that more burdens the world dairy sector still major obstacle to improving production. The aim of this prospective epidemiological study was to develop a mastitis control plan in a Holstein cow herd. The property has been visited for 18 months to harvest data and control plane of the institution. The first four months corresponded to the diagnostic phase, followed by an intervention phase amounting to 14 months. The control plan has reduced from 53.7% to 23.3% subclinical mastitis. The somatic cell count of the tank reduced from 1446 x 10³ cells / ml to 214 x 10³ cells/ml. The prevalence of clinical mastitis was 11.11% and the average incidence was 7.6%. Of the total 704 cases, 30.1% (217/704) could not be evaluated for bacteriological cure because there is no post-treatment samples, 51.3% (249/485) healed, 49.7% (236/485) failed and repeated the same pathogen or failed to isolation of a new pathogen. Of the total 485 cases that could be evaluated for bacteriological cure 71.9% (349/485), 19% (92/485), 7.4% (36/485) and 1.6% (8/485) They were, respectively, related to the first, second, third and fourth cases of clinical mastitis in the same mammary gland. There was treatment failure in 53.65% (44/82), 47.5% (165/347) and 48.21% 27/56, severity one, two and three, respectively. The mastitis control plan was effective in reducing the prevalence of subclinical mastitis and elucidate the clinical mastitis rates through simple measures of management and grounded in proper epidemiological diagnosis.

Keywords: bovine mastitis, milk quality, epidemiology, risk factors.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem apresentando um constante crescimento na produção de leite. Só em 2008, a produção nacional apresentou um crescimento de 5,5%, quando comparada com 2007. Com um rebanho leiteiro de aproximadamente 21,5 milhões de animais, é o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, constituindo índices de produtividade e qualidade ainda desfavoráveis. Em média uma vaca brasileira produz por dia pouco mais de quatro litros de leite, cerca de sete vezes menor que nos Estados Unidos que têm o quarto maior rebanho leiteiro do mundo e é o maior produtor, ou apenas o equivalente a 20% do que uma vaca francesa produz (FAGUNDES, 2012).

A melhoria no cenário do índice de produtividade dos rebanhos brasileiros deve estar alicerçada na adoção de tecnologias que melhorem a eficiência e o uso dos fatores de produção. O aprimoramento das raças, bem como das técnicas de manejo relacionadas à alimentação e à sanidade do rebanho exercem papel fundamental no aumento da produtividade do leite. A crescente preocupação dos consumidores em relação à qualidade dos produtos em geral tem levado a indústria alimentícia a buscar adequações que atendam às exigências do mercado. A demanda por qualidade do leite ocorre em razão de dois fatores importantes: um no que diz respeito ao cumprimento legal de padrões mínimos regidos pela Instrução Normativa N° 62 (IN62) (BRASIL, 2012) e o segundo refere-se às exigências de qualidade por parte da empresa compradora e da percepção pelo consumidor (FIGUEIREDO & PAULILLO, 2005).

No Brasil, mesmo com o estabelecimento de um marco legal em 2002, a Instrução Normativa N° 51 (IN51) (BRASIL, 2012), a qualidade do leite não alcançou os padrões previstos para 2011 que seriam 750 mil UFC/mL de leite (unidade formadora de colônia/mililitro de leite) para contagem bacteriana total (CBT) e 750 mil células/mL de leite para contagem de células somáticas do leite (CCS). Dados da Clínica do Leite/ESALQ-Piracicaba, São Paulo, mostram que 20% e 15% dos produtores não estariam nos padrões para CBT e CCS, respectivamente. Com a revogação da IN51 em dezembro de 2011, a nova legislação a IN62, que estabelece novos limites válidos para 2016, 50% dos produtores estariam fora dos padrões para ambos os requisitos: 400 mil CCS/mL e 100 mil UFC/mL (MILKPOINT, 2011).

A revogação da IN51 e a publicação da IN62 com novos prazos para 2016 demonstra a fragilidade da produção de leite de vaca no Brasil, explicado principalmente pela não adequação de índices de CBT e CCS, principalmente, por mais da metade dos produtores até 2011. Outro ponto é que a IN51 não previa punição para os produtores de leite que não atendessem aos requisitos de qualidade, já na IN62, o produtor será notificado e o produto deverá sofrer destinação indicada pelo estabelecimento, baseado nas Normas de Destinação do Leite e Derivados, incluindo o produtor como peça fundamental para a melhoria na qualidade do leite (BRASIL, 2012).

Para alguns autores, a melhoria da qualidade do leite depende essencialmente da política de aquisição da matéria-prima por parte da indústria (CARVALHO, 2005). Dados recentes publicados pela Clínica do Leite (ESALQ, Piracicaba) com produtores que participam de um programa de valorização por qualidade e outros que não participam, mostram uma melhora significativa na CBT no grupo que participa do programa em relação ao que não participa, sendo 65% e 23%, respectivamente. Quando se analisa a CCS, 55% dos que não recebem por qualidade e 49% dos que recebem por qualidade estariam fora dos padrões da IN62, o que pouco evoluiu em cinco anos de análise, demonstrando que o pagamento por qualidade não é o único fator para a melhoria nos índices de qualidade (CASSOLI, 2012).

Mesmo tendo poucas empresas que pagam por qualidade, há ainda vários critérios que devem ser adotados para que a qualidade no leite no Brasil melhore significativamente: instituição de critérios legais definidos e padronizados; melhoria das condições estruturais do país e incentivo das indústrias para a valorização da qualidade do produto (CARVALHO et al., 2007; MILKPONT, 2011). Conhecer a realidade da produção leiteira no Brasil é primordial, bem como a instituição de um programa de controle da qualidade do leite conciso e embasado em índices epidemiológicos (LANGONI, 2013).

Existem poucos estudos epidemiológicos prospectivos em rebanhos bovinos leiteiros brasileiros, sendo poucos dados sobre fatores de risco para mastite em condições próprias (COENTRÃO et al., 2008). A falta de conhecimento técnico, difusão tecnológica, dados epidemiológicos e estatísticos somam para que o cenário da qualidade do leite no Brasil esteja estagnado, explicando que não houve qualquer tipo

de melhoria nos índices de CCS, indicando que o controle da mastite é um dos grandes desafios dos produtores e técnicos, como demonstrados por Cassoli (2012). Bases sólidas de análises e interpretação destes dados são essenciais para um adequado controle da qualidade do leite (RUEGG, 2003).

A produção de leite de vaca demandará cuidados desde sua produção, transporte e indústria. Na unidade de produção a investigação de problemas de mastite com adequados programas de controle de mastite, baseado em metas para a ocorrência de mastite clínica e subclínica sob estruturada investigação epidemiológica e estatística dos fatores de risco para a infecção só se concretizará com a implementação de programa de controle da qualidade do leite, assim como ocorre nos EUA, Canadá e União Europeia (RUEGG, 2003).

Carvalho et al. (2007) projetando a produção de leite no Brasil em 2020 elaborou um modelo das cinco forças competitivas para a cadeia do leite no Brasil. Como variáveis intermediárias, destacam-se a qualidade do leite produzido e a produtividade, e como variáveis resultantes, destacam-se a produção de leite no Brasil e o perfil da produção. Neste caso a qualidade do leite produzido depende de uma série de fatores na unidade de produção, uma delas é quanto à adoção de um programa de controle das mastites, seja, clínica ou subclínica, visando à melhoria do produto que sai da fazenda.

Por muitos anos o *National Mastitis Council* (NMC) recomendou o programa dos cinco pontos para o controle das mastites. Desenvolvido no Reino Unido na década de 1960, o programa incluía: desinfecção das tetas após a ordenha, terapia da vaca seca, tratamento dos casos clínicos durante a lactação, manutenção adequada do equipamento de ordenha e descarte de vacas com mastite crônica. Há alguns anos o NMC expandiu o programa para dez pontos, a seguir: estabelecimento de metas para saúde do úbere; manutenção do ambiente limpo, seco e confortável; produtos de ordenha adequados; manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha; boa manutenção de registros; gestão adequada de casos de mastite clínica durante a lactação; gestão eficaz das vacas em período seco; manutenção de biossegurança para agentes patogênicos contagiosos e descarte de vacas infectadas cronicamente; acompanhamento regular do estado de saúde do úbere e revisão periódica do programa de controle de mastite (NMC, 2006).

No Brasil são poucos os relatos de implementação de um programa de controle da qualidade do leite que abranja o programa de dez pontos de controle de mastites

(LARANJA e MACHADO, 1994). Revisando a literatura, encontram-se casos onde se instituiu apenas uso do *California Mastitis Test* (CMT) como parâmetro para avaliação de mastite subclínica (MS) correlacionando com dados observacionais de mastite clínica (MC) (DURÃO, 2008), mas há um estudo onde se alcançaram reduções de 38,9% para 2,7% e de 21% para 3,1% em duas propriedades em um plano de controle de mastite durante três anos (LANGONI et al., 1984).

Em um programa de controle e prevenção de mastite, além dos fatores de riscos identificados previamente por estudos epidemiológicos como características do animal, ambiente e procedimentos de manejo, é de extrema importância a avaliação e manutenção periódica do equipamento de ordenha e do reconhecimento dos patógenos causadores das mastites (MEIN, 2012).

Na unidade produtora de leite, a mastite é um entrave à melhoria na qualidade do produto final, sendo esta afecção o maior problema dos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Identificar quanto à ocorrência de MS, MC, fatores de riscos, patógenos presentes, manejo, parâmetros de equipamento de ordenha, ambiente e sazonalidade são essenciais para elucidar as medidas de prevenção a serem seguidas (RUEGG et al., 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cenário do controle de qualidade do leite

A mastite continua sendo uma das mais importantes causas de morbidade de vacas adultas e resulta em diminuição da rentabilidade para a indústria leiteira (USDA, 2008). A consolidação dos rebanhos leiteiros resultou na contínua mudança de rebanhos menores para rebanhos maiores, ou seja, é nítido que o setor vem crescendo (RODRIGUES et al., 2005).

As maiores explorações leiteiras se especializaram para gerenciar a sua própria produção, facilitados aparentemente por serviços gratuitos prestados por grandes empresas multinacionais do setor. Na maioria das fazendas, detecção, diagnóstico e administração de tratamentos para mastite clínica são de responsabilidade dos funcionários, e veterinários são frequentemente consultados apenas quando o caso torna-se de risco para a produção. Vários estudos têm indicado que muitos veterinários são apenas marginalmente envolvidos em programas de controle de mastite. Apenas 24% dos produtores inscritos em um programa de qualidade do leite em Wisconsin, EUA, indicaram que usaram veterinários para planejar programas de qualidade do leite (RODRIGUES et al., 2005).

Pol e Ruegg (2007) indicaram em um estudo, que a maioria dos veterinários especialistas em qualidade do leite passou menos que 10% do seu tempo profissional trabalhando ativamente em algum programa de controle de mastite. Mesmo com este cenário, aparentemente desfavorável, há amplas razões econômicas e sociais para aumentar a participação do médico veterinário em programas de controle mastite bovina.

A ocorrência de mastite reduz a produção de leite, aumenta a quantidade de leite descartado e aumenta os custos de produção e diminui o tempo de vida produtiva devido ao abate prematuro de animais cronicamente infectados (FETROW, 2000). Além disso, tanto MC quanto MS demonstram reduzir a eficiência produtiva (BARKER et al., 1998; SANTOS et al., 2004). O objetivo da medicina veterinária preventiva do setor leiteiro é prevenir as doenças dos rebanhos leiteiros, melhorar o bem-estar animal, reduzir tratamentos e ajudar a garantir a rentabilidade da atividade leiteira. O sucesso da implementação de um plano de controle de qualidade do leite ajuda a atingir esses objetivos e pode resultar em um melhor desempenho econômico para o setor lácteo.

A mastite pode ser controlada pela prevenção de novas infecções e eliminação de casos existentes. O plano de cinco pontos do *National Mastitis Council* usado há anos e posteriormente expandido para um plano de dez pontos vem sendo eficaz para controlar a mastite causada por patógenos contagiosos e reduz a exposição à patógenos ambientais (NMC, 2009). A prevalência de agentes contagiosos diminuiu em rebanhos que se modernizaram e adotaram tais práticas (MAKOVEC e RUEGG, 2003). Há uma tendência, atualmente, que os programas foquem na prevenção de mastite causada por patógenos ambientais e outras questões que influenciam a percepção dos consumidores, que passaram a cobrar por um produto de melhor qualidade.

Historicamente, a percepção da qualidade do leite era definida por parâmetros medidos por laticínios com base apenas nas características do leite cru adquirido por eles. Na maioria dos países, o padrão de qualidade é medido pelo controle de CCS, CBT e detecção de resíduos de antimicrobianos. Atualmente esse conceito vem sendo ampliado, principalmente pela pressão do mercado consumidor em adquirir um leite de boa qualidade, custo acessível e seguro (RUEGG, 2003).

Diante deste cenário, os médicos veterinários que oferecem programas de qualidade do leite devem ter uma sólida compreensão dos conceitos de qualidade do leite, bem como conhecer os problemas práticos vividos em sua região para obter melhores resultados (NMC, 2009).

2.2 Importância do programa de controle de mastite no cenário brasileiro

Devido a sua enorme importância social, o agronegócio do leite ocupa posição de destaque no país. A atividade leiteira é praticada em todo território nacional contendo mais de um milhão de propriedades rurais destinadas para tal fim, sendo 25% do total de estabelecimentos rurais. Na produção primária, gera mais de três milhões de empregos diretos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional (VILELA et al., 2002). O Brasil destaca-se também na produção mundial, segundo Guimarães (2006) baseado nos dados fornecidos pela *International Dairy Federation* (IDF, 2005), o país é o sexto maior produtor de leite.

Fagundes (2003) relatou que o déficit na balança comercial diminuiu de US\$ 445,2 milhões em 1997 para US\$ 207,3 milhões em 2002, o que ainda estava longe do ideal, constituindo-se assim como um país importador de lácteos. No início da década

de 1990 houve a liberalização da importação de produtos lácteos, ficando o Brasil exposto à concorrência direta de países vizinhos como o Uruguai e a Argentina. O Mercosul tornou-se uma dura realidade para a pecuária leiteira nacional, o cooperativismo encolheu e a captação caiu de mais de 60% para 40% (CARVALHO et al., 2007). Este cenário começou a mudar em 2001 devido à aplicação de direitos *antidumping* nas importações de leite em pó proveniente da União Européia, Nova Zelândia, Argentina e Uruguai, dando um novo ânimo ao setor leiteiro brasileiro, possibilitando maior crescimento da produção e industrialização (CARVALHO et al., 2007; FAGUNDES, 2012). Como resultado, em 2004, pela primeira vez, o Brasil alcançou superávit na balança comercial de lácteos, se manteve até o final de 2008, porém a partir de 2009 voltou ao déficit e desde então se mantém em balança comercial negativa (CARVALHO, 2011).

A contribuição da ordenha mecânica para a incidência de mastite é ainda pouco estudada no Brasil, pela sua complexidade de entendimento. Os efeitos relacionados com os equipamentos de ordenhadeira mecânica como causadores de mastite conotam menos importância que outros fatores como o manejo de ordenha e manejo do rebanho, porém as forças aplicadas pelo equipamento de ordenha nas tetas durante quatro a dez minutos, duas ou três vezes ao dia é um fator que pode acarretar sérios problemas em um rebanho, portanto o uso de equipamentos que avaliem periodicamente os parâmetros do equipamento de ordenha mecânica é essencial para um adequado programa de controle de mastite (MEIN, 2012).

Na unidade produtora de leite, a mastite é um entrave à melhoria na qualidade do produto final, sendo esta afecção o maior problema dos rebanhos leiteiros em todo o mundo. A mastite é a inflamação da glândula mamária, de ordem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Constitui o problema mais sério nos rebanhos leiteiros pela sua elevada prevalência, prejuízos pela redução da produção, menor rendimento industrial, comprometimento funcional da glândula mamária, descarte prematuro e ocasional morte de animais (LANGONI et al., 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Estimativas em vários países calculam perdas da ordem de 10 a 15% da produção (SANTOS & FONSECA, 2007). A mastite infecciosa assume o risco à saúde pública pela transmissão de agentes etiológicos de zoonoses tradicionais e emergentes (GUIMARÃES & LANGONI, 2009). A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis da glândula e/ou do leite. Pode ser aguda apresentando sintomatologia evidente

de processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor) ou crônica, caracterizada por fibrosamento, ausência de sinais de processo inflamatório e alterações no leite, como grumos e coágulos (COSTA, 1998).

A forma de evolução subclínica caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira sem que, contudo, sejam observados sinais de processo inflamatório ou fibrosamento, e ausência de modificações visíveis no leite e/ou na glândula mamária. Para o diagnóstico da mastite subclínica são utilizados testes indiretos como o CMT, Whiteside, condutibilidade elétrica, contagem eletrônica de células somáticas, ou em lâmina, pelo método de Prescott Breed (COSTA, 1998; CUNHA et al., 2008).

Para identificação de MS a CCS é o método universalmente mais utilizado e dependendo do objetivo do programa de qualidade do leite, a CCS pode ser estimada por meio de uma variedade de testes como o CMT e os contadores eletrônicos industriais. Em todo mundo, testes de CCS no leite de glândulas mamárias (amostras simples) ou vacas (amostras compostas) são realizadas para tomar decisões de manejo como a identificação de vacas com mastite para o tratamento, ou coleta de amostras de leite para identificação do patógeno existente. Em nível de rebanho, a CCS realizada mensalmente no leite composto de cada vaca em lactação é uma ferramenta indispensável para a estimação de índices epidemiológicos que permitem estudar a dinâmica da mastite na população (PANTOJA et al., 2011).

A CCS no leite normal é constituída de células de defesa e uma proporção menor de células epiteliais originárias do tecido mamário. No leite normal, a CCS é geralmente menor que 200 mil células/mL de leite e aumenta rapidamente na presença de mastite. O aumento da CCS após a infecção depende da bactéria causadora da mastite, sendo os patógenos maiores: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e os coliformes que induzem uma resposta de CCS mais intensa (comumente maior que 600 mil células/ mL) do que àquela observada no leite de vacas infectadas com patógenos menores (*Corynebacterium* spp e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SHELDRAKE et al., 1983; SCHUKKEN et al., 2003).

A variação temporal da CCS após a infecção da glândula mamária também é influenciada pelo patógeno causador e pode apresentar padrões distintos reconhecíveis (SCHEPERS et al., 1997; DE HAAS et al., 2004). Mastite causada por *Escherichia coli* e outras bactérias ambientais, que não são adaptadas ao ambiente da glândula mamária, normalmente resulta em um aumento súbito da CCS (ao redor de dois dias após a infecção), que regride entre três a quatro semanas (ERSKINE et al., 1992; PYORALA

et al., 1994). Pelo contrário, um aumento persistente na CCS (vários meses) é geralmente observado após infecção com patógenos contagiosos. Infecções crônicas também podem resultar em perfis flutuantes de CCS, que se alterna entre o ponto de corte usado para definir uma infecção intramamária (RUEGG et al., 2003).

Em geral, um ponto de corte de 200 mil células/mL tem sido usado universalmente para minimizar a quantidade de resultados falso-positivos e falso-negativos, diminuindo a influência de fatores como fase de lactação, idade, número de quartos infectados, estação do ano e fração do leite coletado (DOHOO and MEEK, 1982; DOHOO & LESLIE, 1991; BARKEMA et al., 1999).

O uso do CMT no momento de ordenha indica qualitativamente o quarto mamário em nível de vaca que precisa ser coletado para cultivo microbiológico do leite, isso porque reações positivas indicam presença de células somáticas, devendo ser confirmadas pela coleta de leite para CCS. Estes parâmetros resultam em dados epidemiológicos valiosos para o rebanho e dependendo do patógeno isolado as ações de controle serão diferentes (LAGO, 2004). Listas históricas dos dados por animal devem ser criadas para que fomente as ações com base na realidade local, principalmente quando os casos de MS resultam em uma mastite clínica, facilitando o posicionamento quanto ao tratamento e qual droga poderá ser usada (RUEGG et al., 2003).

O controle da MC tem se tornado um grande desafio para os produtores leiteiros especializados e é baseada na prevenção de casos novos, tratamento de casos existentes, e descarte de animais doentes (RUEGG, 2003; LANGONI, 2013). Neste contexto os registros de MC são uma ferramenta essencial para medir a eficiência de programas de controle. O uso de registros permanentes ainda é muito limitado e restrito a rebanhos maiores. Mesmo em rebanhos especializados, onde programas de gerenciamento são frequentemente disponíveis, a análise de dados de MC é subutilizada devido à complexidade desta tarefa (PIZÓN & RUEGG, 2011).

O cultivo microbiológico do leite para identificação dos patógenos causadores de mastite seja subclínica ou clínica, no rebanho é uma ferramenta indispensável em programas de controle. Na MS, o cultivo microbiológico de leite de quartos mamários positivos ao CMT ou vacas com CCS composta maior que 200 mil células/mL é uma estratégia para elaboração mensal de uma lista de grupos de vacas-problema, além de gerar dados para elaboração de grupos de interesse que podem ser: vacas recém-paridas, vacas cronicamente infectadas e vacas com infecções novas. Para monitoramento da MC, coleta e armazenamento de leite de quartos afetados, devem ser congeladas e

enviadas ao laboratório para cultivo microbiológico, estabelecendo o perfil de patógenos presentes no rebanho o que determinará os tipos de tratamento e manejo empregado no programa de controle (RUEGG, 2003).

O intervalo de tempo para definir um caso repetido de MC na mesma vaca como um caso novo varia entre os pesquisadores e consultores, mas deve ser consistente na mesma fazenda, normalmente adota-se 14 dias. Para monitorar a eficiência do tratamento coleta-se uma amostra no dia do caso da mastite clínica e uma segunda amostra 21 dias após o diagnóstico e comparando com o resultado das duas culturas pode-se definir se houve cura ou não dependendo dos patógenos isolados nos dois exames (PIZÓN & RUEGG, 2011).

A elaboração de programas de controle de qualidade do leite em fazendas leiteiras no Brasil é ainda uma realidade a ser alcançada, pois muitos estudos são pontuais e levam em consideração poucas variáveis analisadas, pouco tempo de estudo, interpretação inadequada dos dados obtidos, falha na tomada de decisões, sazonalidade dos dados e falta de mão de obra especializada. Estudos que elenquem os principais fatores de risco para a melhor qualidade do leite em rebanhos brasileiros, devem ser instituídos, analisados e discutidos para que em todo território nacional estes dados possam ser usados a fim de induzir os produtores a buscarem melhor produção, valorização, competitividade e maior rentabilidade, visto que o setor leiteiro nacional vem sofrendo mudanças e a cadeia produtiva tem cobrado cada vez mais um produto de melhor qualidade.

2.3 Definição de mastite bovina

A definição de infecção intramamária (IIM) tem sido amplamente discutida, mas nem sempre é consistente (ANDERSEN et al., 2010). Muitas vezes as definições de IIM e MS são quase sempre indistintamente utilizadas (BARKEMA et al., 1998). A IIM implica na presença de um micro-organismo infeccioso e esta definição é embasada com o requisito de aumento de CCS (BERRY; MEANY, 2006). A MS indica inflamação, porém não necessariamente infecção do úbere (IDF, 2011), no entanto MS é na maioria das vezes causada por infecção bacteriana (DJABRI et al., 2002).

Muitos estudos têm utilizado apenas o leite de quartos mamários de uma ordenha para o diagnóstico de IIM, outros, porém utilizam amostras em duplicata e até em triplicata (HILLERTON; COOPER; MORELLI, 2007). A utilização da CCS é

baseada em ponto de corte, dicotomizando o resultado em negativo ou positivo que pode variar a depender dos objetivos entre 100 a 300 mil CCS/mL de leite (SCHUKKEN et al., 2003).

Na prática, a IIM pode ser definida pela isolamento de um micro-organismo, com isolamento puro do causador da infecção em meios de cultivos. A mensuração pela CCS deve ser um indicativo de infecção quando superior a 200 mil CCS/mL de leite (DOHOO et al., 2011).

2.4 Mastite clínica e subclínica

A infecção da glândula mamária pode se manifestar de forma clínica ou subclínica. A MC é marcada por respostas inflamatórias mais graves, que resultam em mudanças visíveis da secreção láctea ou do tecido mamário, caracterizada por sinais clínicos perceptíveis como dor, inchaço e rubor do úbere, aparência deprimida do animal, perda de peso e posturas anormais, além da perda funcional do tecido secretor do leite (HORTET; SEEGER, 1998).

A MS é a principal forma de mastite nas fazendas leiteiras modernas, que pode acometer de 20-50% das vacas em lactação, entretanto uma avaliação de custos relacionada a um caso de MS não parece ser fácil, e isto se deve ao efeito da diluição do leite produzido por quartos sadios sobre os afetados, o que torna imperceptível esta forma de mastite quando realizadas mensurações de qualidade do leite por amostras compostas ou de leite do tanque (FORSABACK et al., 2010). Na MS não há mudanças visíveis nas características do leite ou do úbere, mas é a forma mais predominante e que apresenta maior importância epidemiológica por ser transmitida de forma silenciosa pelo rebanho (BRADLEY, 2003). Um agravante, é que essa forma de mastite pode se tornar crônica, mesmo permanecendo indefinidamente em uma fase subclínica, mas algumas vezes alterna entre a forma clínica e subclínica (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Os programas de controle de mastite têm sido eficientes ao longo dos anos em controlar as mastites causadas por patógenos contagiosos, porém os ambientais têm sido problema para as propriedades que utilizam sistemas intensivos de produção de leite (BRITTEN, 2012). Um fato vem sendo estudado há alguns anos em decorrência de que a incidência de MS causada por patógenos primários (contagiosos, principalmente) em

fazendas onde o sistema de produção não é intensivo vem apresentando decréscimo em relação a incidência de MS causada por agentes secundários (ambientais, principalmente) (PYORALA et al., 1994).

2.5 Micro-organismos causadores de mastite bovina

Cento e trinta e sete diferentes espécies de micro-organismos podem causar mastite, sendo que a causa mais comum da infecção do tecido glandular são bactérias, mas também pode ser causada por fungos, algas, e até mesmo por vírus (BRADLEY, 2003).

Segundo Bradley e Green (2005) os patógenos principais são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* e são responsáveis pela redução de qualidade do leite por provocarem resposta imunológica de diferentes intensidades. *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativa são classificados como patógenos secundários, devido ao moderado aumento da CCS (SCHUKKEN, 2003).

A literatura mundial classifica os micro-organismos causadores de mastite em dois grupos com base em sua origem: patógenos contagiosos e ambientais. Os patógenos contagiosos são aqueles adaptados à glândula mamária, caracterizados pela alta incidência de MS, porém persistentes ou com episódios clínicos intermitentes de baixa incidência (BRADLEY, 2003). Os patógenos contagiosos são transmitidos entre vacas ou entre quartos durante a ordenha por contaminação do equipamento de ordenha, mãos dos ordenhadores, ou toalhas que são utilizadas em mais de um animal (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Essa mastite é também associada com a diminuição na produção de leite e aumento de CCS do tanque. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são exemplos de patógenos contagiosos (SCHUKKEN et al., 2003).

Os patógenos ambientais têm origem no ambiente em que a vaca vive, com maior prevalência das bactérias coliformes e algumas espécies de *Streptococcus*. São ditos oportunistas por invadirem a glândula mamária sem conseguir se adaptar em seu interior, o que leva à imediata indução de resposta imune (BRADLEY, 2003). A MC é caracterizada por infecções de curta duração que podem resultar até em morte do animal. Normalmente, fazendas com baixas CCS do leite do tanque são acometidas pela ocorrência de mastite ambiental (SCHUKKEN, et al., 2003).

Pertencem à família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp), *Pseudomonas* spp, leveduras, fungos, algas e certas espécies do gênero *Streptococcus*. Esses são veiculados por manejo inadequado de camas, excesso de sujeira nas áreas de permanência dos animais, higiene inadequada no preparo de pré-ordenha, ou por objetos em instalações e pastos que favoreçam a ocorrência de lesões nos tetos (COSTA, 1998).

Entre os contagiosos destacam-se *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, e *Mycoplasma* spp. São conhecidos como “vaca dependentes”, transmitidos a partir de vacas infectadas ou portadoras para outras no momento da ordenha, pelas mãos de ordenhadores, equipamentos de ordenha, toalhas de secagem dos tetos e outros fômites de uso comum entre os animais (COSTA, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Implementar e avaliar um programa de controle de qualidade do leite em um rebanho de vacas de leite.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Elaborar um plano para diagnóstico e controle das mastites: detecção do problema;
- ✓ Monitorar a ocorrência de mastite subclínica e clínica;
- ✓ Identificar fatores de risco para infecção;
- ✓ Elaborar um plano de controle de mastites;
- ✓ Planejar medidas preventivas;
- ✓ Avaliar a eficiência das medidas adotadas no plano de controle de mastite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O programa de controle de qualidade do leite foi implementado após uma fase de investigação (diagnóstico) e posterior intervenção (plano de controle de mastite) Figura 1, de acordo com Ruegg (2003).

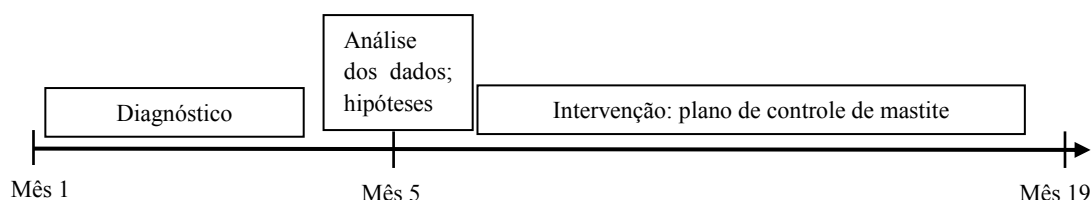
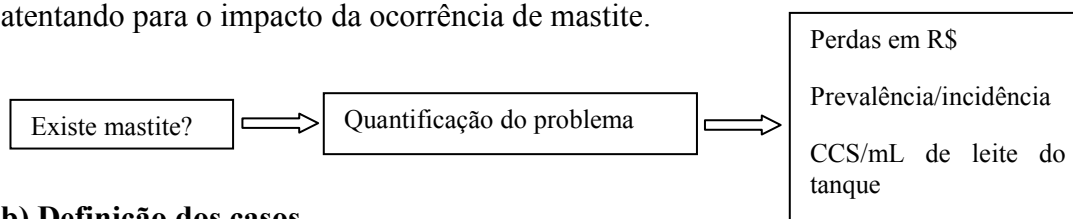


Figura 1. Plano de trabalho em três fases para a efetiva realização do programa de controle de mastite em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo 2015.

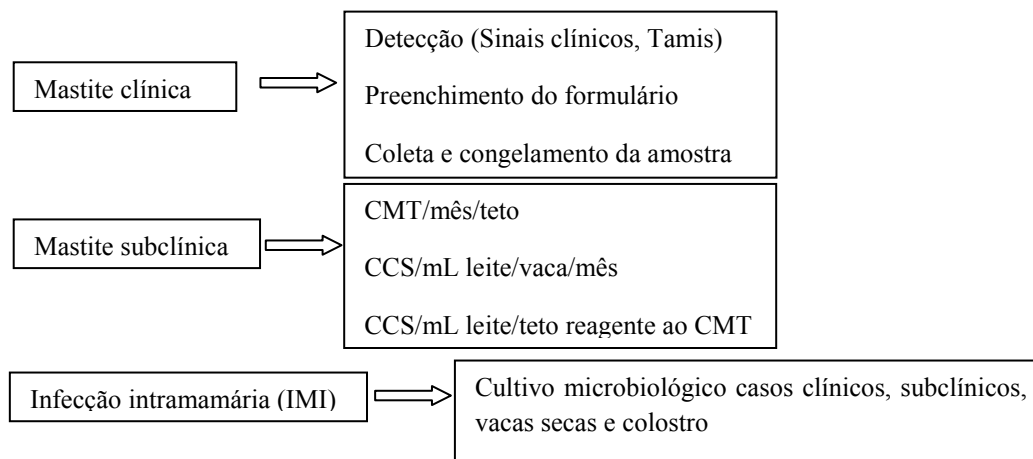
a) Definição do problema

Nesta fase foi essencial a padronização, a identificação e a avaliação do rebanho atentando para o impacto da ocorrência de mastite.



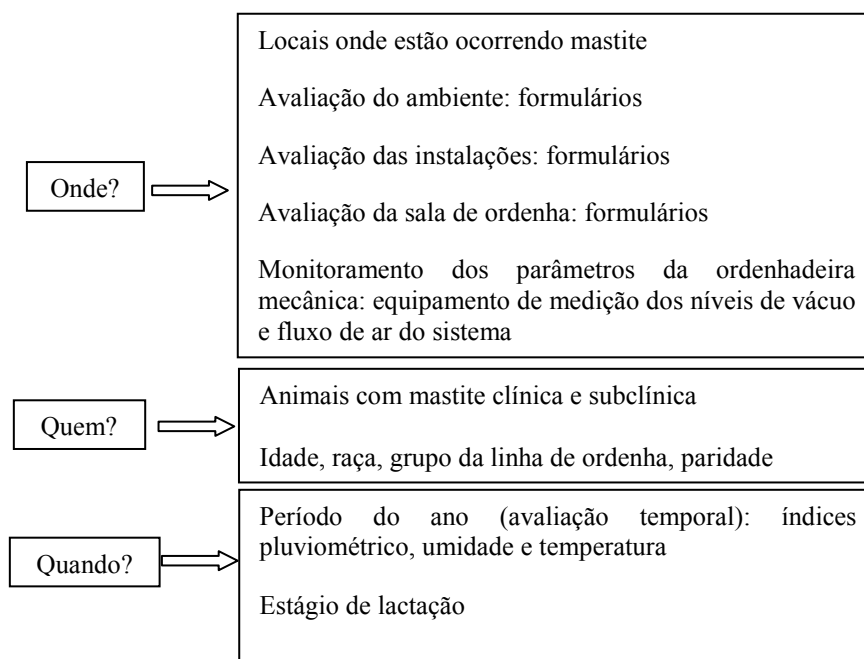
b) Definição dos casos

A padronização e o adequado diagnóstico neste momento geraram dados homogêneos ao longo do estudo, permitindo a comparação entre as fases de diagnóstico e a intervenção.



c) Identificação de fatores de risco

Identificação dos fatores de risco a partir da avaliação das variáveis e o seu peso para a ocorrência de mastite clínica e subclínica, dando subsídio para formular ações que culminaram em possíveis melhorias nos índices produtivos.



4.2 Unidade produtiva de leite

A fazenda utilizada no estudo localiza-se na região geográfica Centro do Estado de São Paulo, município de São Pedro. Possui clima tropical de altitude, 580m acima do nível do mar, bioma de cerrado e temperatura média de 22° C. Possui um típico rebanho leiteiro de vacas Holandesas, sendo ordenhadas mecanicamente por sistema carrossel, com capacidade para 17 vacas. Possui em média 330 vacas em lactação/mês ordenhada três vezes por dia com perspectivas de crescimento de 8-15% anualmente, produz em média 11 mil kilogramas de leite/dia, destinado pelo menos a dois laticínios situados na região. Foi assinado um termo de responsabilidade entre o produtor, que esteve disposto disposto a seguir as recomendações e o orientador, a fim de estabelecer o compromisso com o presente estudo.

4.3 Plano do estudo

Durante o período de abril de 2012 a outubro de 2013 foram realizadas as seguintes etapas do projeto:

1) Diagnóstico e definição do problema: levantamento epidemiológico do status de mastite no rebanho. O período para diagnóstico e definição do problema compreendeu, portanto os meses de abril, maio, junho, julho e agosto (Figura 1).

2) Análise preliminar dos dados e levantamento de hipóteses: esta fase ocorreu imediatamente após a fase de diagnóstico. O levantamento realizado nos primeiros cinco meses do estudo foram compilados a fim de gerar hipóteses para a formulação das ações de controle dos meses subsequentes. Exatamente no quinto mês do estudo (agosto/2012) o relatório da fase de diagnóstico foi confeccionado e discutido para as possíveis intervenções realizadas;

3) Fase de intervenção – plano de controle de mastite: com os dados elencados na fase de diagnóstico, após adequada interpretação foram formuladas ações para tentativa do plano de ação para o controle de mastite no rebanho estudado. Esta fase iniciou-se em agosto de 2012 e foi até outubro de 2013.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP), no *campus* de Botucatu, São Paulo.

4.4 Detalhamentos dos progressos realizados

4.4.1 Análise preliminar de dados e formação da equipe de qualidade do leite

Antes da primeira visita, foi realizada uma análise dos dados de produção e CCS para estimar índices epidemiológicos de mastite e as perdas financeiras decorrentes dessa doença. Informações sobre a propriedade foram registradas, tais como identificação da fazenda, nome do produtor e responsáveis pelo manejo dos animais e médico veterinário responsável. A equipe foi formada por funcionários da fazenda que se comprometeram com as etapas a serem realizadas no plano proposto.

4.4.2 Visita de exploração

Uma visita inicial foi realizada para registrar características de todas as categorias animais e práticas de manejo como dimensões das instalações, densidade de animais por instalação, características da cama como material, profundidade e tempo de renovação, frequência de remoção das fezes dos corredores e cubículos, e tipo de piso. A rotina de ordenha foi documentada e as práticas utilizadas foram avaliadas. Ao final da visita, as equipes do estudo e da propriedade se reuniram para definir os objetivos de qualidade do leite. Subsequentemente, as mesmas avaliações foram realizadas mensalmente como parte do banco de dados.

4.4.3 Durante a ordenha

O desempenho dos ordenhadores foi avaliado quanto às atividades realizadas na sala de ordenha.

A rotina de ordenha foi avaliada medindo o tempo de cada ação (tempo de contato do pré-dipping, tempo do estímulo de ejeção do leite e o tempo de ordenha). Outros eventos também foram mensurados como: o número de quedas do conjunto de teteiras, o uso da ordenha em modo manual e qualidade da aplicação do pós-dipping. Estes dados foram anotados em formulários criados para cada observação.

Sistemas de avaliação foram utilizados para estimar a higiene do úbere (escore de úbere) e a condição das extremidades das tetas, quanto à presença de hiperqueratose. Escores de higiene do úbere foram registrados em uma escala de 1 a 4 (limpo a muito sujo) e a condição morfológica da teta em uma escala de 1 a 4 (1 = lisa sem queratina, 2 = presença de um anel sem queratina, 3 = presença de um anel com pouca queratina e 4 = presença de um anel com muita queratina (NEIJENHUIS et al., 2000; RUEGG, 2003).

A avaliação dos níveis de vácuo e fluxo de ar do sistema do equipamento de ordenha mecânica não foram realizados como previsto, pois não foi possível a aquisição do equipamento necessário para esta etapa.

4.5 Coleta de amostras de leite

4.5.1 Monitoramento da mastite subclínica

Foram realizadas visitas mensais durante todo o período do estudo, coletando-se leite para o monitoramento da MS de todo o rebanho. Como teste de triagem para amostras do leite dos quartos mamários foi o CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957), qualitativo para a presença de células somáticas e amostras de leite com escores positivo (+, ++ ou +++). Foram coletadas tanto para CCS, quanto para cultivo microbiano. Independente do CMT positivo ou negativo, foi coletada amostra de leite composta de cada vaca para CCS. Quando pelo menos um quarto mamário foi positivo ao CMT, foi coletado 15 mL de leite para cultivo microbiano em tubos estéreis e 50 mL de leite do respectivo quarto mamário para CCS individual em frasco plástico contendo conservante celular bronopol (BERTRAND, 1996). Foi também coletada amostra de leite do tanque de expansão para CCS. A CCS foi realizada em equipamento Somacount 300[®] (Bentley, UK) por citometria de fluxo, no Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS – FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo.

A MS foi considerada quando a CCS foi maior que 200 mil células/mL de leite. Os seguintes índices epidemiológicos foram calculados com base em testes de CCS consecutivos: 1) casos novos: vacas que apresentassem um teste anterior menor que 200 mil células/mL de leite e o consecutivo maior; 2) casos crônicos: considerados quando houvesse dois testes consecutivos maiores que 200 mil células/mL de leite; 3) vacas curadas: quando um teste anterior com mais de 200 mil células/mL e o consecutivo menor e 4) vacas sadias: quando dois testes consecutivos apresentassem menos que 200 mil células/mL de leite. Esses índices foram mensurados mensalmente.

As perdas econômicas referentes à ocorrência de mastite subclínica foram calculadas de acordo com Shook (1982). Mensalmente os dados foram tabulados em planilhas, a fim de elaborar um documento que contemplasse todo o histórico da vaca, para acesso destes dados na rotina diária da fazenda.

4.5.2 Monitoramento da mastite clínica – registro de mastite clínica

Paralelamente foi instituído um registro de casos de MC. Protocolo de avaliação de cada caso clínico diagnosticado era anotado em planilha específica disposta na fazenda,

preenchidas logo que a mastite era diagnosticada contendo os seguintes itens: vaca, teto, início do caso clínico, severidade da mastite (severidade 1: quando alterações no leite; severidade 2: quando alterações visíveis no leite e no úbere; severidade 3: quando alterações visíveis no leite, no úbere e a vaca apresentou-se apática) , medicamento utilizado, via de aplicação do medicamento, total de dias de descarte do leite, término do tratamento, total de dias que o leite demorou em retornar ao normal e se houve perda do teto. Paralelamente no momento do diagnóstico uma amostra de leite do quarto foi coletada, antes do tratamento, e congelada para cultivo microbiano. Vinte e um dias após o tratamento da MC, uma segunda amostra do mesmo caso clínico foi coletada e congelada para cultivo microbiano. Foram considerados como caso novo de mastite clínica, aqueles ocorridos após 14 dias ao caso anterior, e quando o micro-organismo fosse diferente na segunda amostra de leite (RUEGG, 2003; PIZÓN & RUEGG, 2011).

Foram calculadas as taxas de cura com o tratamento da mastite clínica, consistência do protocolo e custo com o tratamento.

4.5.3 Cultivo microbiano

O cultivo microbiano foi realizado de acordo com os procedimentos do *National Mastitis Council* (NMC, 1999). Inicialmente foram cultivados 10 microlitros de cada amostra, em meios de ágar sangue ovino a 8% e ágar MacConkey incubando-se a 37° C aerobicamente, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, durante 3 dias. A morfologia das colônias era avaliada, com relação ao tamanho, forma, odor, pigmento e hemólise. As colônias isoladas em ambos os meios de cultivos foram repicadas em caldo cérebro-coração (BHI), estudadas quanto às características fenotípicas e morfológicas pela coloração de Gram e classificadas bioquimicamente, de acordo com Hirsh e Zee (2003).

Foram consideradas como amostras positivas as que revelaram o isolamento de três ou mais colônias de um mesmo micro-organismo, exceto para *Staphylococcus aureus* que foi considerado a partir do isolamento de uma colônia. No caso de isolamento de três ou mais micro-organismos a amostra foi considerada como contaminada.

4.5.4 Identificação de *Staphylococcus aureus*

De acordo com as características fenotípicas das colônias, como tamanho, produção de pigmento e hemólise, e morfologia como cocos Gram positivos agrupados na bacterioscopia, foi realizada a prova de catalase para confirmação do gênero, diferenciando-se de *Streptococcus* spp. Sendo a prova positiva, a cepa foi submetida à prova de coagulase. Uma vez positivo à prova de coagulase em tubo, foram classificadas como *Staphylococcus aureus* as cepas que fermentaram a maltose, o manitol e trealose; produziram acetoina e apresentaram resistência a polimixina-B (KONEMAN et al., 1997).

4.5.5 Identificação de *Streptococcus* spp.

Os estreptococos isolados nas amostras de leite foram diferenciados por meio de quatro testes:

1) Crescimento em meio de Edwards modificado; 2) Camp Test; 3) Hidrólise da esculina; e 4) Teste de tolerância à de bile-esculina (HIRSH E ZEE, 2003).

1) Crescimento em meio de Edwards modificado: usado para isolamento seletivo de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus faecalis*. Os espécimes que cresceram neste meio em até 24 horas foram selecionados para os testes a seguir tendo como prerrogativa estarem no grupo dos cocos Gram positivos catalase negativo.

2) Camp test: O fator CAMP (Catherine, Atkins, Muench e Petersen) produzido pelo micro-organismo atua de forma sinérgica com a beta-hemolisina produzida por *S. aureus* e para tanto utilizou-se a cepa ATCC 25923. Foi semeada uma estria central desta e estrias perpendiculares de colônias de estreptococos confirmadas pelo teste anterior a uma distância de 0,5 cm. A placa foi incubada à 37°C por 24 horas. O resultado foi considerado como positivo quando apresentaram formação de uma seta ou meia-lua na intersecção do crescimento das duas bactérias. O resultado foi negativo quando não houve a formação deste sinergismo (QUIN et al., 1994).

3) Hidrólise da esculina: micro-organismos do grupo dos cocos catalase negativo, em especial os *Streptococcus uberis* e o *Enterococcus faecalis* toleram a bile a 40% e hidrolisam a esculina. Bactérias possuindo um sistema enzimático capaz de hidrolisar provocam a formação de esculetina, que ao reagir com íons ferro, dá origem a um complexo de cor escura, causando enegrecimento do meio, correspondente a reação positiva. A reação negativa é observada quando a superfície do meio não altera a coloração (HIRSH E ZEE, 2003).

4) Tolerância à bile-esculina: a capacidade de hidrolisar a esculina em presença de bile é uma característica de todos os estreptococos do grupo D de Lancefield e do gênero *Enterococcus*. Cepas suspeitas, que cresceram em Edwards modificado foram inoculadas no meio denominado Bile-Esculina, e foram consideradas como positivas aquelas que cresceram e apresentaram uma coloração escura do meio em placa de Petri, e negativas quando não apresentaram crescimento.

Foram considerados como *Streptococcus agalactiae* aqueles que cresceram no Edwards modificado, Camp test positivo, esculina e bile-esculina negativos; *Streptococcus dysgalactiae* foram considerados quando cresceram no meio de Edwards modificado, Camp Test negativo, esculina e bile-esculina negativos; foram considerados como *Streptococcus uberis* quando cresceram no meio de Edwards modificado, Camp Test negativo, esculina positivo e bile-esculina negativo; micro-organismos que cresceram no meio de Edwards modificado, Camp Test negativo, esculina e bile-esculina positivos foram diferenciados quanto a prova de tolerância ao NaCl 6,5% realizado em caldo BHI acrescido de NaCl e glicose, onde a turbidez indicou tolerância e estes foram classificados no gênero *Enterococcus* diferenciando-os dos *Streptococcus* do grupo D de Lancefield (QUIN et al., 1994).

4.5.6 Identificação de enterobactérias

O leite semeado em placa de Petri contendo ágar MacConkey foi incubado a 37°C por 24 a 48 horas (NMC, 1999). Evidenciando-se o crescimento foram anotadas as características morfológicas quanto à produção de muco ou não, bem como se foram ou não fermentadoras da lactose. Foram submetidas à coloração de Gram e prova de citocromo oxidase e repicadas em BHI para posterior caracterização bioquímica utilizando os testes da Escola Paulista de Medicina (EPM), MILi (motilidade, indol,

lisina) e o citrato de Simmons. Os resultados foram analisados com base na tabela de classificação de enterobactérias (KONEMAN et al., 1997).

4.5.7 Identificação de *Corynebacterium* spp.

Em casos suspeitos de *Corynebacterium* spp. pelas características fenotípicas das colônias, tempo de crescimento e morfologia pelo Gram, foram repicadas de duas a três colônias em caldo BHI adicionado de 1% de tween-80, incubando-se por 24 horas. Os micro-organismos suspeitos foram congelados em solução de glicerol a 20% para posterior identificação.

4.5.8 Outros patógenos isolados

Micro-organismos eventualmente isolados foram identificados seguindo recomendações no National Mastitis Council (1999).

4.6 Diagnóstico e processamento das informações

Os dados foram tabulados em planilha de Excel e processados com as seguintes características de cada animal mensalmente, que foram cedidas pela fazenda: raça, idade, número de lactações, dias em lactação, número de lactações, status reprodutivo, produção diária, histórico de doenças anteriores e produção mensal. Ao final do quinto mês, um relatório dos fatores de risco foi efetuado, aliado com as avaliações de CMT, CCS, cultivo microbiano, monitoramento da mastite subclínica e clínica. Foi efetuado um diagnóstico e posterior instituição de um plano de ação contra os principais problemas observados, discutido entre todos os participantes do projeto.

4.7 Elaboração do programa de controle da qualidade do leite: intervenção

Durante os cinco primeiros meses, foi realizado um diagnóstico, um estudo observacional do rebanho, sem quaisquer intervenções. Munidos destas informações, os dados foram avaliados estatisticamente e elaborado um plano de ação contendo primeiramente os principais pontos a serem atingidos para melhoria da qualidade de

produção. O diagnóstico dos primeiros cinco meses resultou em uma lista de problemas ou fatores de risco que tiveram sua avaliação contínua, levando-se em consideração o custo-benefício das possíveis intervenções indicadas para a melhoria.

Foi elaborado um plano de ações que durou 15 meses, contemplando uma lista de ações focando-se nas intervenções que têm maiores impactos no problema de qualidade do leite. Esta lista gerada com os dados dos cinco primeiros meses tiveram intervenções de comum acordo, com informações claras e diretas no que tange à eliminação dos problemas. Novas ações foram instituídas assim que os fatores de risco foram sendo elucidados.

4.8 Ações indicadas na fase de intervenção

Durante os primeiros cinco meses, considerado como fase de diagnóstico, usava-se no pré-dipping uma composição à base de ácido láctico (Biofoan® Delaval) uma solução espumante, formulada com ingredientes naturais com ação respeitando um tempo de 30 segundos. No pós-dipping usava-se o composto SalvoDip B (GEA Farm Technologies®) que continha glicerina, alantoína, lanolina, polipropileno glicol, aloe vera e PVP (polivinilpirrolidona), basicamente ácido láctico.

Já na fase de intervenção foi indicado o Theraflex um composto à base de iodo, porém usado no pré-dipping na concentração de 0,5% e indicou-se no pós-dipping o mesmo composto, porém na concentração de 1%.

4.8.1 Tratamento de mastite clínica

Padronizou-se de acordo com a severidade sendo que para severidade grau um, seria realizado três dias de tratamento e severidade graus dois e três indicou-se seis dias de tratamento. Neste ponto, em dezembro de 2012 (cinco meses decorrido da fase de intervenção) foi abolido este tipo de prática e foi indicado para todos os casos de mastite clínica, cinco dias de tratamento, independente da severidade do caso. O tratamento deveria ser discutido com os responsáveis pela fazenda baseando-se na história da vaca, disponibilizado em um planilha de resultados mensais.

4.8.2 Tratamento de mastite subclínica

As vacas com isolamento de *Streptococcus agalactiae*, tão logo fossem identificadas passaram por *blitzterapia*, que consistiu no tratamento da glândula afetada com penicilina.

Vacas de alta produção e de importância genética, mesmo com isolamento crônico de *Staphylococcus aureus* não foram encaminhadas para descarte, porém indicou-se a secagem forçada e definitiva da glândula afetada com 10 mL de iodopovidona à 10% após a ordenha total. Aquelas com isolamento deste patógeno, porém em dois ou mais quartos, foi indicado o descarte ao final da lactação, sendo entretanto, remanejadas para o último lote, para ordenha final.

4.8.3 Descarte de animais

Na fase de intervenção foi elaborada uma lista de descarte mensal, baseada na planilha de resultados e respeitando-se alguns critérios: vacas com isolamento de *Staphylococcus aureus* e de *Streptococcus agalactiae* que não curassem após à *blitzterapia*; repetidoras de MC; vacas cronicamente infectadas de forma subclínica por *Pasteurella* spp.; vacas com CCS crônica com idade avançada, baixa fertilidade e baixa produção de leite.

4.8.4 Pré e pós-dipping

No pré-dipping foi usado iodo a 0,5% até dezembro de 2012 e a partir deste mês iniciou-se com o cloro a 0,5%. No pós-dipping indicou-se a mudança do ácido láctico para o iodo a 1%.

4.8.5 Linha de ordenha

Readequação e formação de linha de ordenha que até a fase de diagnóstico era feita de forma inadequada, onde as vacas recém paridas permaneciam no mesmo ambiente que o lote cinco, ou seja, lote de vacas problema. Foi indicada a mudança de stall e entrada destes animais no primeiro lote, antes de todos os outros. O segundo lote foi formado por vacas de primeira lactação sem histórico de mastite clínica e subclínica, o terceiro lote era formado por vacas de segunda lactação ou mais, de alta produção, o quarto lote era formado por vacas que se recuperavam de episódios de mastite e o

quinto lote foi designado como lote problema, onde as vacas deveriam ser tratadas e terem o leite descartado.

4.8.6 Acompanhamento do plano de controle da qualidade do leite

Ao passo que ações indicadas pelo diagnóstico foram implementadas, estas também foram monitoradas e revisadas mensalmente. A eficiência do programa de controle foi mensurada realizando coletas mensais e os registros de MC e MS do mesmo modo que foram realizadas nos primeiros cinco meses. Relatórios mensais, acompanhamento e revisões das ações instituídas para a melhoria na qualidade do leite, foram realizadas mensalmente.

4.9 Análise estatística

Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar a população e estimar índices produtivos e epidemiológicos de importância de acordo com Dohoo (2010).

Análise univariada foi realizada para identificar possíveis fatores de risco para a ocorrência de mastite no rebanho. Testes de Qui-quadrado e Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foram usados para testar a associação entre a presença de mastite clínica ou subclínica e vários fatores de manejo, ambientais e de produção (DOHOO, 2010).

Modelos de regressão logística (PROC GLIMMIXQ, SAS Institute, 2009) foram usados para identificar fatores de risco para mastite em análise multivariada. A razão das chances (*odds ratio*) foi a medida de associação de escolha (DOHOO, 2010).

Para avaliar a eficácia do programa, modelos lineares mistos e regressão logística foram usados para comparar os índices epidemiológicos e produtivos entre as fases de diagnóstico e intervenção, corrigindo para fatores de confusão como estação do ano. O nível de significância estatística foi definido em 0.05 (DOHOO, 2010).

Para avaliação do tamanho do efeito tanto para mastite subclínica quanto para mastite clínica foi usado o modelo linear generalizado misto para variável binária a ser analisada com função de ligação logito (FIELD, 2009).

Neste modelo entraram como preditoras para mastite subclínica e mastite clínica as seguintes classes: número de lactação (1 = uma lactação, 2 = duas lactações e 3 = três ou mais lactações); dias em lactação (1 = 1 – 90, 2 = 91 – 180, 3 = 181 – 270 e 4 = > 270 dias em lactação); mês (foi usado apenas o efeito linear para esta classe); produção

diária média e o estado subclínico da vaca um mês (prev1), dois (prev2) e três meses (prev3) antes de cada análise. O efeito de vaca foi considerado aleatório (FIELD, 2009).

$$MS \text{ ou } MC(t) = (\text{Número de lactações} + DIM + \text{Produção diária de leite} \\ + prev1 + prev2 + prev3) + erro(t).$$

Para avaliação do sucesso do tratamento da mastite clínica foi utilizado o Teste de Qui-quadrado e Fischer quando necessário para testar a associação entre o insucesso do tratamento com as variáveis mensuradas. Para tanto foram testadas as associações entre o insucesso na terapia de casos de mastite clínica com a ordem do caso; se primeiro, segundo, terceiro ou quarto caso na mesma glândula; a variável mês; a severidade do caso, se grau 1, 2 ou 3; duração do tratamento; dias em lactação (1 = 1 – 90, 2 = 91 – 180, 3 = 181 – 270 e 4 = > 270 dias em lactação); número de lactação 1 = uma lactação, 2 = duas lactações e 3 = três ou mais lactações); tipo de tratamento, se tópico ou associado; princípio ativo do antimicrobiano e micro-organismo isolado do caso clínico.

A classe de micro-organismos foi subdividida em 6: classe 1 compreendeu: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*; classe 2 compreendeu: *Staphylococcus* coagulante-negativa, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus* spp. do grupo D, *Pasteurella* spp., *Prototeca* spp., *Trueperella pyogens*., bacilos gram positivos irregulares e o grupo dos outros actinomicetales; a classe 3 compreendeu: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* sp., *Providencia rettgeri*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Edwardisiella tarda*, *Serratia marcescens* e *Hafnia alvei*; a classe 4 compreendeu: *Geothricum candidum*, *Candida* sp. e outros fungos; a classe 5 compreendeu culturas microbiológicas contaminadas e classe 6 compreendeu as amostras com cultura microbiológica negativa.

Durante todo o estudo o tratamento de MC não sofreu controle, ou seja, não foi indicado à propriedade o uso de qualquer antimicrobiano sendo este critério adotado estritamente pelos funcionários e gerentes. Foram usados ao longo do estudo 20 formulações diferentes de antimicrobiano, porém aquelas com amostragem

estatisticamente significativas para entrarem no modelo estatístico foram sete. A classe 1 compreendeu o cloridrato de ceftiofur na concentração de 125 mg/dose; a classe 2 compreendeu o sulfato de cefquinoma na concentração de 88 mg/dose; a classe 3 compreendeu a ciprofloxacina na concentração de 100 mg/dose; a classe 4 compreendeu o cefoperazone sódico na concentração de 250 mg/dose; a classe 5 compreendeu a formulação à base de tetraciclina na concentração de 200 mg/dose, neomicina na concentração de 250 mg/dose, bacitracina na concentração de 28 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose; a classe 6 compreendeu a formulação à base de tilosina na concentração 20 mg/dose e propilenoglicol (a concentração não foi possível precisar); a classe 7 que compreendeu a formulação à base de cefalexina na concentração de 100 mg/dose, neomicina na concentração de 100 mg/dose, miconazol na concentração de 200 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose; e por fim, a classe 8 que compreendeu casos de MC sem tratamento.

4.10 Modelagem matemática para a infecção subclínica causada por *Corynebacterium* spp.

Para analisar a dinâmica da infecção subclínica causada pelo *Corynebacterium* spp. foi utilizado um modelo adaptado proposto por Kermack e Mckendrick (1927). Este modelo estuda a dinâmica de uma doença, principalmente causada por micro-organismos contagiosos e é denominado de modelo SIR (S = susceptíveis, I = infectados e R = recuperados).

No presente estudo o modelo foi adaptado utilizando-se S, I, C e R que são quartos mamários sadios, infectados, crônicos e recuperados, configurando-se o seguinte fluxograma para elucidar a transmissão da doença entre os indivíduos:

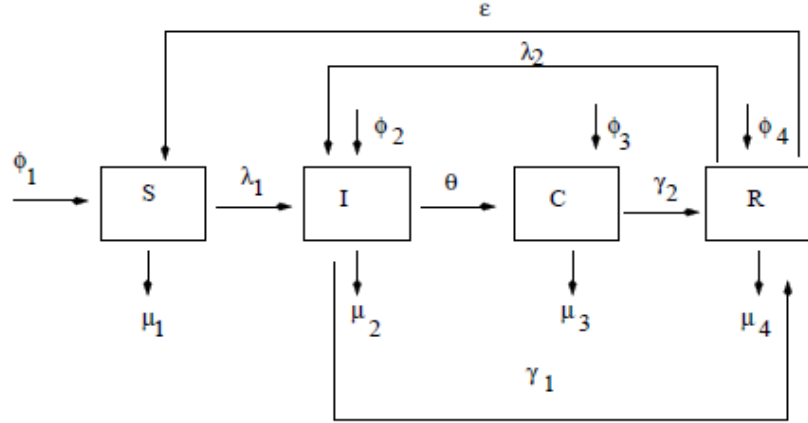


Figura 2. Diagrama mostrando os diferentes tipos de compartimentos considerados no modelo matemático para a infecção subclínica causada por *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas e o fluxo de indivíduos. Botucatu, São Paulo, 2015.

Conhecidos, $S(0) = S_0$, $I(0) = I_0$, $C(0) = C_0$ e $R(0) = R_0$, os tamanhos de cada população de indivíduo no instante de tempo inicial, $t = 0$, tem-se que a evolução temporal de cada população, ou seja, $S = S(t)$, $I = I(t)$, $C = C(t)$ e $R = R(t)$ é dada pelas seguintes equações:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= \phi_1 - \lambda_1 S - \mu_1 S + \epsilon R, \\ \frac{dI}{dt} &= \phi_2 + \lambda_2 R + \lambda_1 S - (\gamma_1 + \theta + \mu_2)I, \\ \frac{dC}{dt} &= \phi_3 + \theta I - (\mu_3 + \gamma_2)C, \\ \frac{dR}{dt} &= \phi_4 + \gamma_1 I + \gamma_2 C - \lambda_2 R - (\mu_4 + \epsilon)R, \end{aligned} \quad (1)$$

sendo

$$\lambda_1 = \beta_1 \left(\frac{\tau I + C}{N} \right) \quad \lambda_2 = \beta_2 \left(\frac{\tau I + C}{N} \right),$$

e

$$0 \leq \tau \leq 1, \quad \beta_2 \geq \beta_1, \quad \gamma_2 \geq \gamma_1, \quad \phi_3 = 0, \quad \phi_1 = (1-\rho)\Psi, \quad \phi_4 = \rho\Psi \quad \text{com} \quad N = S+I+C+R.$$

Tabela 1. Descrição dos parâmetros do modelo matemático para infecção de mastite subclínica por *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas.

parâmetros
β_1 (unidade [mês ⁻¹]) taxa de transmissão por indivíduo <i>I</i> ou <i>C</i> para <i>S</i>
β_2 taxa de transmissão por indivíduo <i>I</i> ou <i>C</i> para <i>R</i>
θ taxa de cronicidade por indivíduo
γ_1 taxa de recuperação por indivíduo - <i>I</i>
γ_2 taxa de recuperação por indivíduo - <i>C</i>
μ_1 descarte por indivíduo - <i>S</i>
μ_2 descarte por indivíduo - <i>I</i>
μ_3 descarte por indivíduo - <i>C</i>
μ_4 descarte por indivíduo - <i>R</i>
ρ (sem unidade) proporção de indivíduos novos <i>R</i>
τ (sem unidade) diferença de transmissividade dos <i>C</i> e <i>I</i>

A partir dos dados obtidos (Tabela 2) foram estimados os seguintes parâmetros (Tabela 3):

$$\Psi, \phi, \gamma_1, \gamma_2, \theta, \mu_1, \mu_2, \mu_3 \quad \text{and} \quad \mu_4.$$

Tabela 2. Tempo (mês), o total do número de quartos mamários (N), o número de quartos mamários em cada compartimento (infectado, cronicamente infectado, recuperados, susceptíveis) e o número de chegada de indivíduos em cada um destes compartimentos ($\phi_1 + \phi_4$, $\phi_2 + \phi_3$). Botucatu, São Paulo, 2015.

Mês	N	Infectada	Cronicamente infectada	Recuperados	Susceptíveis	Ψ^*	Φ_2^{**}
1	956	-	-	-	-	889	67
2	1216	48	9	39	702	396	24
3	1180	46	15	39	894	182	2
4	1272	33	17	36	954	225	7
5	1288	49	14	30	1051	141	3
6	1280	49	20	35	1056	119	1
7	1240	28	18	39	1015	137	3
8	1272	42	11	25	1066	127	1
9	1244	37	13	26	1064	102	2
10	1236	31	10	29	1030	136	0
11	1316	48	16	24	1108	120	0
12	1348	16	10	26	1020	273	3
13	1404	42	6	18	1114	223	1
14	1440	26	10	15	1177	212	0
15	1548	20	8	23	1249	246	2
16	1508	20	5	15	1356	112	0
17	1496	15	5	6	1326	142	2
18	1496	13	4	10	1345	124	0
19	1504	8	1	9	1326	160	0

*Quartos mamários negativos. **Quartos mamários que já chegaram infectados com *Corynebacterium* spp.

Tabela 3. Tempo (mês) e parâmetros (%) estimados dos dados obtidos no presente estudo. Botucatu, 2015.

Mês	μ_1	μ_3	μ_2	μ_4	γ_1	γ_2	θ
1	-	-	-	-	-	-	-
2	16.24	22.22	28.26	5.13	75.76	54.14	24.24
3	12.30	20.00	16.67	20.51	70.00	61.54	30.00
4	11.11	23.53	27.27	16.67	70.83	53.85	29.17
5	10.18	21.43	16.33	23.33	65.86	54.55	34.15
6	14.11	30.00	16.33	20.00	73.17	53.33	26.83
7	6.80	33.33	21.43	25.64	80.95	41.67	19.05
8	9.66	36.36	23.81	28.00	75.00	25.00	25.00
9	11.47	30.77	24.32	23.08	82.14	50.00	17.86
10	3.79	0.00	3.23	0.00	56.67	80.00	43.33
11	17.78	56.25	30.58	29.17	79.31	42.86	20.69
12	12.75	10.00	25.00	34.62	76.92	77.78	23.08
13	12.48	66.67	47.62	27.78	63.64	50.00	36.36
14	8.92	10.00	15.38	13.33	86.36	50.00	13.64
15	9.05	37.50	25.00	30.43	93.33	25.00	6.67
16	10.03	40.00	60.00	13.33	50.00	66.67	50.00
17	8.37	20.00	46.67	16.67	62.50	75.00	37.50
18	9.44	25.00	46.15	20.00	100.00	66.67	0.00

4.10.1 Análise de estabilidade da solução livre da dinâmica da infecção por *Corynebacterium* spp.

O parâmetro R_0 , razão de reprodutibilidade basal, foi obtido através da análise do sistema de equações quanto a existência e estabilidade das soluções. Este é um parâmetro que depende do modelo e só pode ser obtido em regime de equilíbrio estacionário. Ele foi obtido utilizando a abordagem descrita por Driessche e Watmough (2002), a qual utiliza o operador de próxima geração. Neste caso, foi sugerido que $\phi_2 = 0$. Assim, a partir de:

$$\begin{aligned}\frac{dI}{dt} &= \beta_2 \left(\frac{\tau I + C}{N} \right) (N - S - I - C) + \beta_1 \left(\frac{\tau I + C}{N} \right) S - (\gamma_1 + \theta + \mu_2)I, \\ \frac{dC}{dt} &= \theta I - (\mu_3 + \gamma_2)C, \\ \frac{dS}{dt} &= (1 - \rho)\Psi - \beta_1 \left(\frac{\tau I + C}{N} \right) S - \mu_1 S + \epsilon(N - S - I - C)\end{aligned}$$

calcula-se

$$\mathcal{F} = \begin{pmatrix} \frac{\beta_2(\tau I + C)}{N}(N - S - I - C) + \frac{\beta_1(\tau I + C)}{N}S \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

e

$$\mathcal{V} = \begin{pmatrix} (\gamma_1 + \theta + \mu_2)I \\ -\theta I + (\mu_3 + \gamma_2)C \\ -(1 - \rho)\Psi + \frac{\beta_1(\tau I + C)}{N} + \mu_1 S \end{pmatrix}.$$

Para $(I^*, C^*, S^*) = (0, 0, N)$ obtém-se:

$$F = \left(\begin{array}{cc} \frac{\partial \mathcal{F}_1}{\partial I} & \frac{\partial \mathcal{F}_1}{\partial C} \\ \frac{\partial \mathcal{F}_2}{\partial I} & \frac{\partial \mathcal{F}_2}{\partial C} \end{array} \right) \bigg|_{(0,0,N)} = \begin{pmatrix} \beta_1 \tau & \beta_1 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

$$V = \left(\begin{array}{cc} \frac{\partial \mathcal{V}_1}{\partial I} & \frac{\partial \mathcal{V}_1}{\partial C} \\ \frac{\partial \mathcal{V}_2}{\partial I} & \frac{\partial \mathcal{V}_2}{\partial C} \end{array} \right) \bigg|_{(0,0,N)} = \begin{pmatrix} \gamma_1 + \theta + \mu_2 & 0 \\ -\theta & \mu_3 + \gamma_2 \end{pmatrix},$$

sendo R_0 o raio espectral (maior autovalor) da matriz FV^{-1} :

$$R_0 = \frac{\beta_1 \tau (\mu_3 + \gamma_2) + \beta_1 \theta}{(\mu_3 + \gamma_2)(\gamma_1 + \theta + \mu_2)}.$$

Se $R_0 > 1$ a doença consegue invadir e se estabelecer na população, caso contrário, não. Uma maneira mais intuitiva de se obter R_0 é lembrando da definição, ou seja, R_0 representa (mensura) o número médio de infecções secundárias (novos casos de infecção ou incidência) causadas pela chegada de um indivíduo infectado numa população de susceptíveis ao longo do seu período infeccioso, logo, pode ser calculado o início do processo. A partir da Figura 2 tem-se que:

1. Entra no compartimento I : $E1 = \phi_2 + \lambda_1 S^* + \lambda_2 R^*$;
2. Sai do compartimento I : $E2 = (\theta + \mu_2 + \gamma_1)I^*$.

Dado que $C^* = \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} I$, temos:

$$E1 = \phi_2 + \frac{\beta_1}{N}(\tau I^* + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} I^*) S^* + \frac{\beta_2}{N}(\tau I^* + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} I^*) R^*.$$

No equilíbrio livre da doença devemos $\phi_2 = 0$, $R^* = 0$ e $S^* = N$, portanto:

$$R_0 = \frac{E1}{E2} = \frac{\beta_1}{(\theta + \mu_2 + \gamma_1)} \left(\tau + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} \right).$$

Sensibilidade R_0 aos parâmetros (OLI et al., 2006):

$$\begin{aligned} \Delta R_0 &= \frac{1}{\theta + \mu_2 + \gamma_1} \left(\tau + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} \right) \Delta \beta_1 \\ \Delta R_0 &= \frac{\beta_1}{\theta + \mu_2 + \gamma_1} \Delta \tau \\ \Delta R_0 &= -\frac{\beta_1}{(\theta + \mu_2 + \gamma_1)} \frac{\theta}{(\mu_3 + \gamma_2)^2} \Delta \gamma_2 \quad (\text{ou } \Delta \mu_3) \\ \Delta R_0 &= -\frac{\beta_1}{(\theta + \mu_2 + \gamma_1)^2} \left(\tau + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} \right) \Delta \gamma_1 \quad (\text{ou } \Delta \mu_2) \\ \Delta R_0 &= \left(\frac{-\beta_1}{(\theta + \mu + \gamma_1)^2} \left(\tau + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} \right) + \frac{\beta_1}{\theta + \mu_2 + \gamma_1} \frac{1}{\mu_3 + \gamma_2} \right) \Delta \theta \end{aligned}$$

Incrementos (ou decrementos) em β_1 ou τ aumentam (ou diminuem R_0), sendo neste caso diretamente proporcional. Por outro lado, incrementos (ou decrementos) em γ_1 , γ_2 , μ_2 ou μ_3 diminuem (ou aumentam) R_0 , demonstrando um caráter inversamente proporcional para estes parâmetros.

Por outro lado, o número reprodutivo efetivo, $R_f(t)$, mede o número médio de infecções secundárias, incidência, produzidas por um indivíduo infectado durante o seu período infeccioso, neste caso, a fração de indivíduos susceptíveis na população é menor que um, de maneira que nem todos os contatos resultam em um novo caso (BARLOW et al., 2009):

$$R_f(t) = \frac{\bar{\beta}_1 S(t) + \bar{\beta}_2 R(t)}{\theta + \mu_2 + \gamma_1} \left(\tau + \frac{\theta}{\mu_3 + \gamma_2} \right).$$

5. RESULTADOS

5.1 Características do rebanho

Foram avaliadas todas as vacas ordenhadas ao longo dos 19 meses de estudo, totalizando 699 (338 ± 35), que de forma pareada estavam divididas conforme a Figura 3.

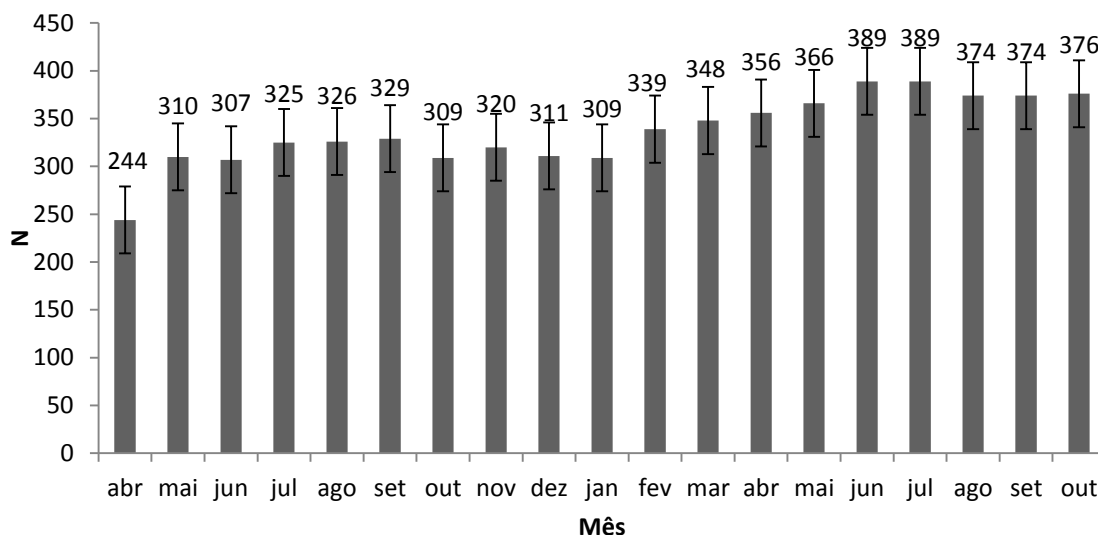


Figura 3. Distribuição de frequência de vacas analisadas por mês no presente estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.

A média de número de lactações foi de 2,20 (0,11) lactações por vaca, portanto, o rebanho era composto por vacas jovens (Figura 4).

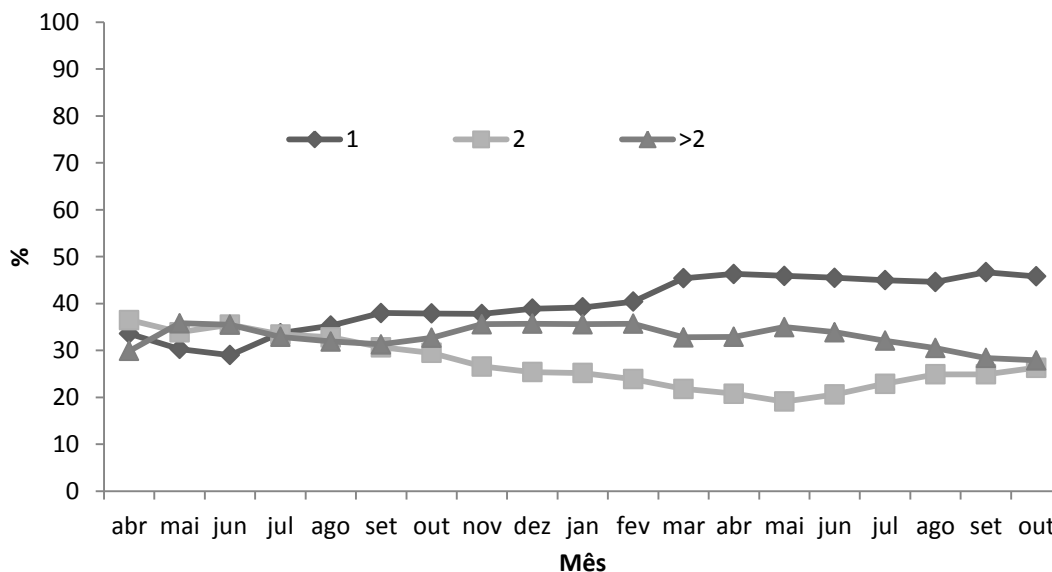


Figura 4. Conformação do rebanho em relação ao número de lactações de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

A média de dias em lactação das vacas por mês foi de 175 (10,1), demonstrando que a reposição de animais era adequada, além de eficiência reprodutiva (Figura 5).

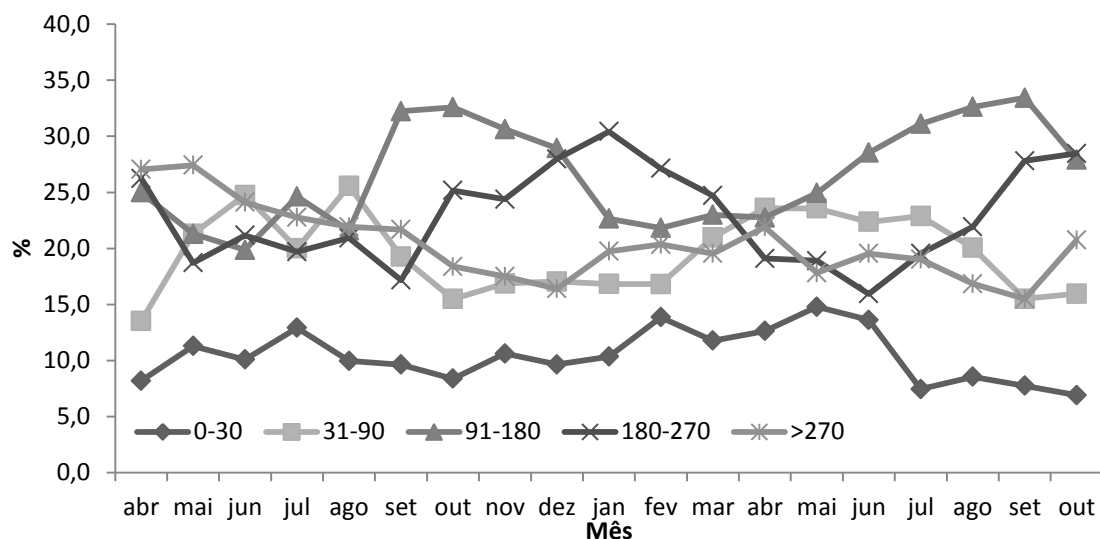


Figura 5. Conformação do rebanho em relação à média de dias em lactação de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

A produção média individual de leite do rebanho foi de 32,65 (1,70) litros por dia (Figura 6) e a média de produção diária total foi de 13 256 (889) litros.

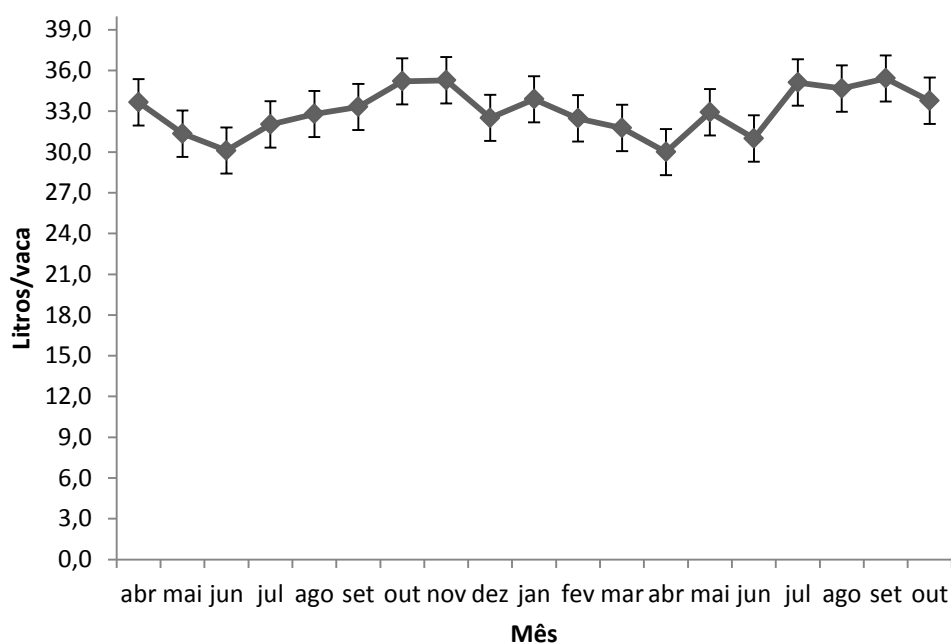


Figura 6. Média de produção individual de leite de vaca Holandesa. Botucatu, São Paulo, 2015.

5.2 Mastite subclínica

5.2.1 Análise descritiva

A média de CCS do tanque foi de 316 047 (137,21) CCS/mL de leite. Ao longo dos meses do estudo houve considerada redução, principalmente após a adoção das medidas de controle (Figura 7).

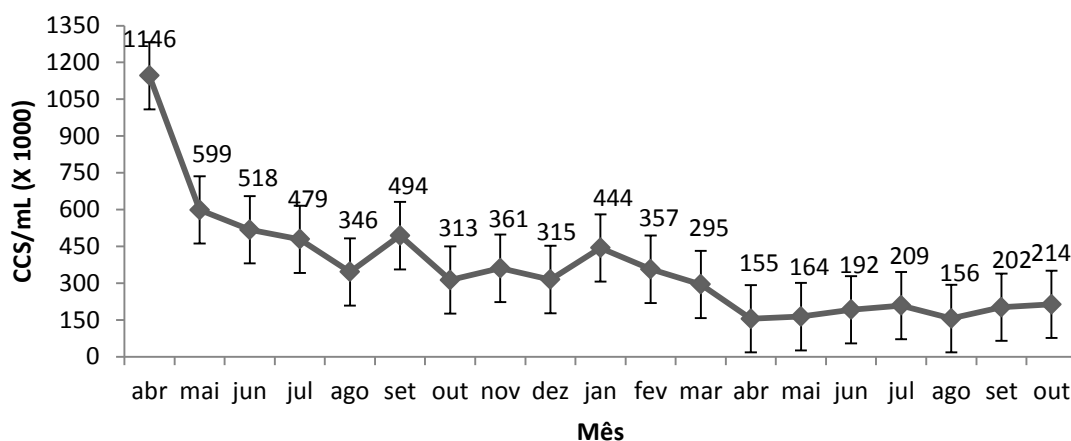


Figura 7. Contagem de células somáticas do tanque de expansão de leite de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Os primeiros quatro meses, que correspondem à fase de diagnóstico, pelo menos metade das vacas estavam com mastite subclínica. A média de mastite subclínica em todo o período do estudo foi de 39,33% (Figura 8).

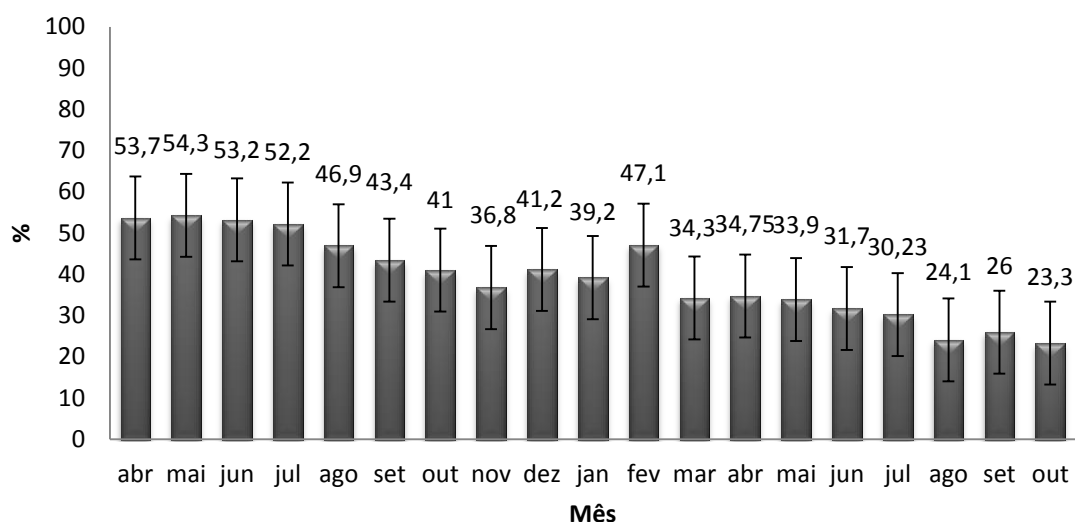


Figura 8. Prevalência de mastite subclínica no rebanho de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Na Figura 9 pode ser avaliado o status de mastite subclínica. Houve uma importante redução na taxa de vacas crônicas após a implementação das medidas de controle, principalmente pela identificação individual e indicação de descarte. A taxa de novos casos se manteve constante, sempre ao redor ou acima dos 10%, considerada alta. Conseguiu-se uma redução do tempo da doença por algum fator, seja ele o descarte ou até mesmo a cura espontânea.

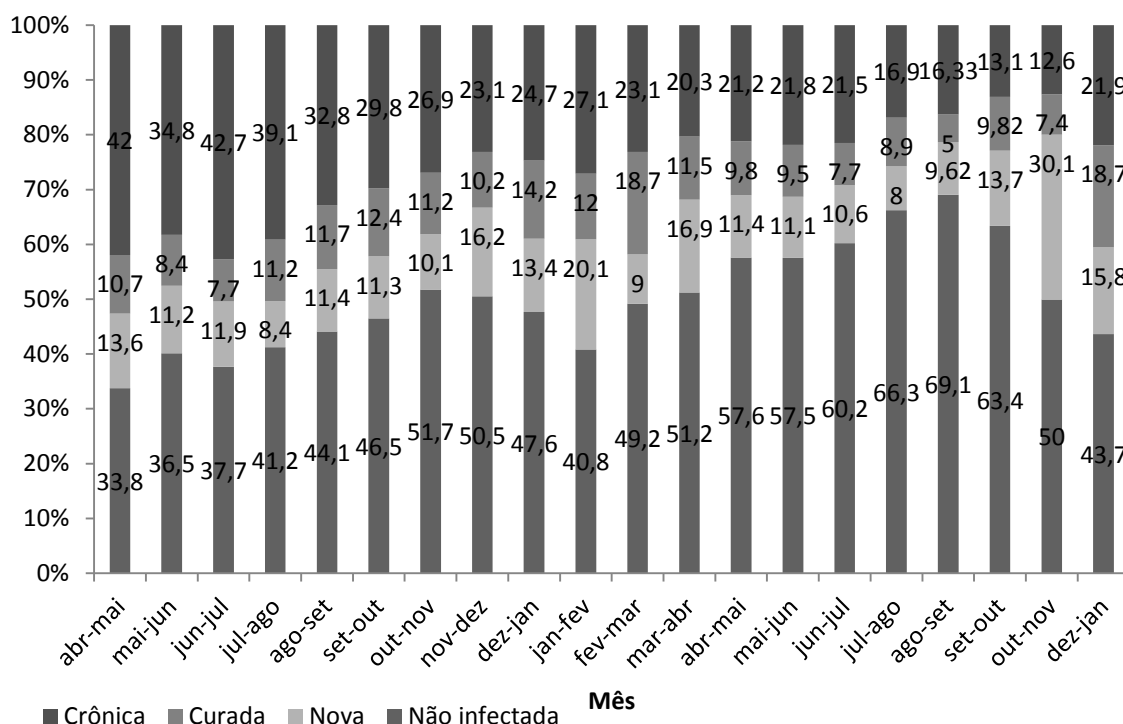


Figura 9. Status de infecção da mastite subclínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Para o cálculo de incidência o gráfico anterior tende a mascarar o valor real, visto que considera o número total de vacas no denominador, portanto é uma incidência “aparente”. O cálculo da incidência deve ser feito levando-se em consideração que o denominador é um número de vacas em risco, ou seja, que não apresentavam a doença no mês anterior ($\text{CCS/mL} < 200$ mil), mas que apresentaram mastite subclínica no mês subsequente ($\text{CCS/mL} > 200$ mil), e neste caso foi denominado de incidência “real” (Figura 10).

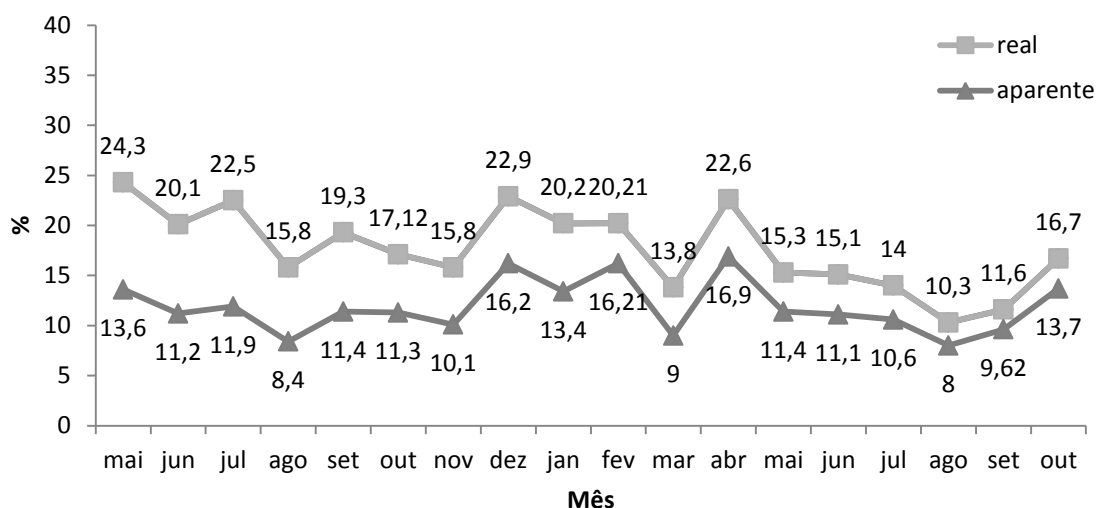


Figura 10. Incidência real e aparente de mastite subclínica do rebanho de vacas Holandesas submetidas controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

O maior desafio de um programa de controle é justamente impedir que novos casos ocorram, porém em fazendas de leite há inúmeros fatores que influenciam para que novos casos ocorram. Em fazendas de alta produção a taxa aceitável é de 5 – 8%. Fatores como número de lactações (Figura 11) e estágio de lactação (Figura 12) podem influenciar a ocorrência de MS. Quanto mais tempo o animal permanece na ordenha, maiores são as chances de adquirir a doença, assim como para a número de lactações.

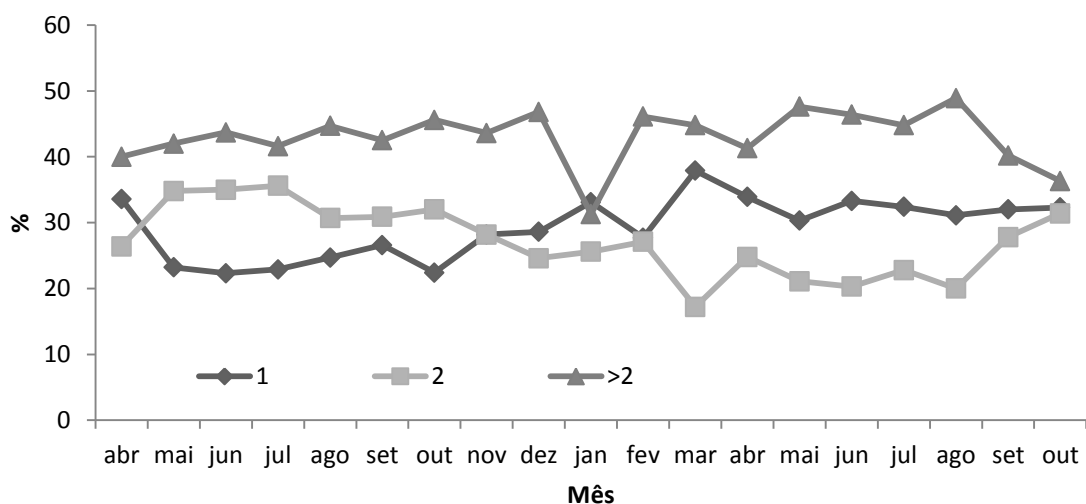


Figura 11. Prevalência de mastite subclínica em relação ao número de lactações de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite Botucatu, São Paulo, 2015.

Em relação ao número de lactações quando se analisa pontualmente mês a mês, notou-se que ocorreram poucas mudanças nos padrões de MS, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto que foram estatisticamente significativos para mastite subclínica em relação ao número de lactações de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Mês	N. lactação**	Estimativa	EP**	Valor p*	OR**	IC**
1	1	- 1,22	0,39	0,002	0,30	- 2,01 – (- 0,47)
	2	- 1,26	0,37	0,0006	0,28	- 1,99 – (- 0,55)
2	1	- 1,34	0,33	< 0,0001	0,26	- 2,01 – (- 0,71)
3	1	- 1,33	0,33	< 0,0001	0,26	- 2,00 – (- 0,69)
4	1	- 1,57	0,33	< 0,0001	0,21	- 2,23 – (- 0,93)
5	1	- 1,55	0,32	< 0,0001	0,21	- 2,21 – (- 0,93)
	2	- 0,98	0,31	0,0014	0,38	- 1,60 – (- 0,40)
6	1	- 1,54	0,33	< 0,0001	0,21	- 2,20 – (- 0,91)
	2	- 0,65	0,31	0,03	0,52	- 1,26 – (- 0,05)
7	1	- 1,93	0,35	< 0,0001	0,15	- 2,64 – (- 1,25)
	2	- 0,75	0,32	0,02	0,47	- 1,29 – (- 0,12)
8	1	- 0,88	0,30	0,003	0,41	- 1,47 – (- 0,29)
9	1	- 1,07	0,29	0,0002	0,34	- 1,65 – (- 0,51)
10	1	- 0,76	0,29	0,0085	0,47	- 1,33 – (- 0,20)
11	1	- 1,69	0,31	< 0,0001	0,18	- 2,32 – (- 1,08)
	2	- 0,81	0,34	0,01	0,44	- 1,50 – (- 0,14)
12	1	- 1,49	0,31	< 0,0001	0,23	- 2,12 – (- 0,90)
	2	- 1,43	0,37	0,0001	0,24	- 2,18 – (- 0,71)
13	1	- 1,17	0,29	< 0,0001	0,31	- 1,76 – (- 0,60)
14	1	- 1,31	0,28	< 0,0001	0,27	- 1,87 – (- 0,77)
15	1	- 1,19	0,27	< 0,0001	0,30	- 1,74 – (- 0,65)
	2	- 0,69	0,32	0,03	0,50	- 1,34 – (- 0,07)
16	1	- 1,14	0,28	< 0,0001	0,32	- 1,70 – (- 0,60)
17	1	- 1,28	0,30	< 0,0001	0,28	- 1,88 – (- 0,70)
18	1	- 1,13	0,30	0,0002	0,32	- 1,74 – (- 0,54)

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, N. lactação = número de lactação e EP = Erro padrão.

Vacas com três lactações ou mais foram desde o começo do estudo aquelas que tiveram a maior chance de estar com MS, por isso o modelo fixou esta variável. Notou-se que em todos os meses as primíparas não sofreram tanta pressão para desenvolver MS, mesmo que a partir do 10º mês a frequência tenha sido gradativamente maior (Figura 10).

A frequência relativa de MS em vacas de primeira lactação foi maior que as outras duas classes (vacas de 2ª e acima de 2 lactações), conforme observado na Figura

3. Isso reforça que a pressão de infecção estava igualmente distribuída entre as vacas, porém dentro de cada classe as vacas acima de duas lactações tiveram probabilidade maior de desenvolverem MS. Esse padrão de MS é condizente com o perfil de infecção causada por patógenos contagiosos (RUEGG, 2012).

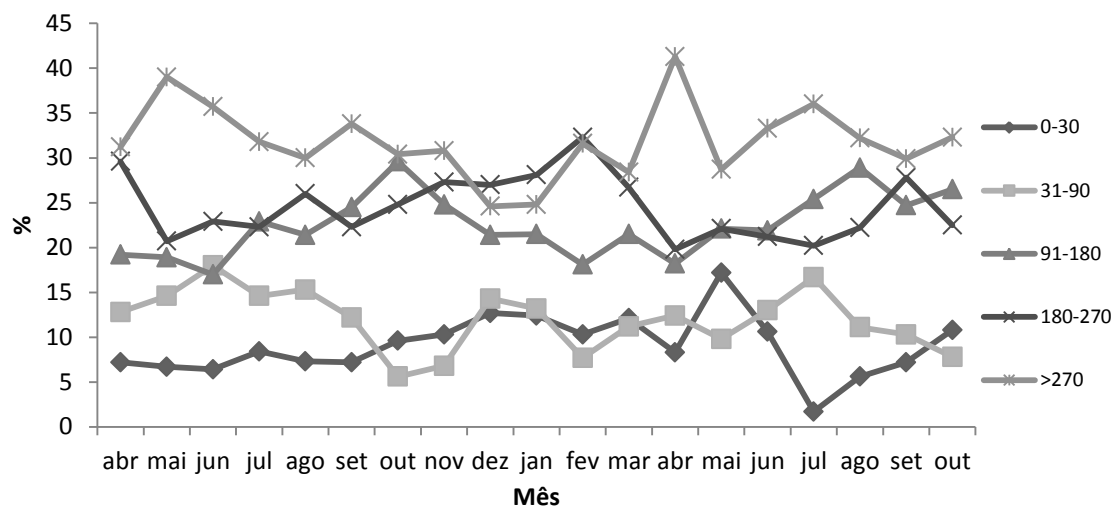


Figura 12. Prevalência de mastite subclínica proporcional aos dias em lactação de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Os parâmetros estimados de MS em relação aos dias em lactação (DIM) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto que foram estatisticamente significativos para mastite subclínica em relação aos dias em lactação de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Mês	DIM**	Estimativa	EP**	Valor p*	OR**	IC**
1	-	-	-	-	-	-
	1 – 90	- 1,74	0,35	< 0,0001	0,18	- 2,46 – (- 1,08)
2	91 – 180	- 1,11	0,39	0,004	0,33	- 1,90 – (- 0,35)
	181 – 270	- 0,89	0,40	0,03	0,41	- 1,68 – (- 0,10)
	>270	-	-	-	-	-
3	1 – 90	- 1,56	0,36	< 0,0001	0,21	- 2,30 – (- 0,88)
	91 – 180	- 1,20	0,40	0,003	0,30	- 2,00 – (- 0,42)
	181 – 270	- 1,02	0,39	0,001	0,36	- 1,81 – (-0,26)
	>270	-	-	-	-	-
4	1 – 90	- 1,51	0,36	< 0,0001	0,22	- 2,24 – (-0,81)
	91 – 180	- 0,95	0,38	0,01	0,39	- 1,71 – (- 0,21)
	181 – 270	- 0,89	0,40	0,02	0,41	- 1,70 – (-0,11)
	>270	-	-	-	-	-
5	1 – 90	- 1,18	0,36	0,001	0,31	- 1,90 – (- 0,47)
	91 – 180	- 1,04	0,37	0,005	0,35	- 1,79 – (- 0,31)
	>270	-	-	-	-	-
6	1 – 90	- 1,05	0,37	0,004	0,35	- 1,79 – (- 0,34)
	91 – 180	- 0,76	0,37	0,04	0,47	- 1,50 – (- 0,03)
	>270	-	-	-	-	-
7	1 – 90	- 1,07	0,42	0,01	0,34	- 1,92 – (-0,25)
	>270	-	-	-	-	-
	1 – 90	- 1,79	0,39	< 0,0001	0,17	- 2,59 – (-1,03)
8	91 – 180	- 1,02	0,37	0,006	0,36	- 1,77 – (- 0,29)
	>270	-	-	-	-	-
9	91- 180	- 0,80	0,38	0,03	0,45	- 1,57 – (-0,05)
	>270	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	1 – 90	- 1,75	0,38	< 0,0001	0,17	- 2,53 – (- 1,01)
	91 – 180	- 1,00	0,40	0,01	0,37	- 1,80 – (-0,23)
	>270	-	-	-	-	-
12	1 – 90	- 1,04	0,36	0,003	0,35	- 1,76 – (- 0,34)
	91 – 180	- 0,77	0,39	0,04	0,46	- 1,55 – (- 0,01)
	>270	-	-	-	-	-
13	1 – 90	- 2,11	0,34	< 0,0001	0,12	- 2,81 – (- 1,44)
	91 – 180	- 1,88	0,37	< 0,0001	0,15	- 2,64 – (- 1,16)
	181 – 270	- 1,29	0,36	0,0004	0,28	- 2,02 – (- 0,59)

Mês	DIM**	Estimativa	EP**	Valor p*	OR**	IC**
	>270	-	-	-	-	-
14	1 – 90	- 1,44	0,34	< 0,0001	0,24	- 2,13 – (- 0,78)
	91 – 180	- 0,95	0,37	0,01	0,39	- 1,17 – (- 0,22)
	181 – 270	- 0,76	0,37	0,04	0,47	- 1,52 – (- 0,03)
	>270	-	-	-	-	-
15	1 – 90	- 1,60	0,32	< 0,0001	0,20	- 2,25 – (-0,97)
	91 – 180	- 1,23	0,34	0,0003	0,29	- 1,92 – (- 0,57)
	>270	-	-	-	-	-
16	1 – 90	- 1,38	0,36	0,0002	0,25	- 2,12 – (- 0,67)
	91 – 180	- 0,99	0,34	0,005	0,37	- 1,70 – (- 0,29)
	181 – 270	- 0,94	0,36	0,01	0,39	- 1,67 – (- 0,22)
	>270	-	-	-	-	-
17	1 – 90	- 1,51	0,39	0,0001	0,22	- 2,31 – (- 0,74)
	91 – 180	- 1,05	0,37	0,004	0,35	- 1,79 – (- 0,33)
	181 – 270	- 0,99	0,38	0,01	0,37	- 1,76 – (- 0,23)
	>270	-	-	-	-	-
18	1 – 90	- 1,32	0,40	0,001	0,27	- 2,14 – (- 0,54)
	91 – 180	- 1,06	0,38	0,005	0,35	- 1,82 – (-0,32)
	181 – 270	- 0,82	0,36	0,02	0,44	- 1,55 – (- 0,10)
	>270	-	-	-	-	-

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, DIM = Dias em lactação e EP = Erro padrão.

Ao longo do estudo as vacas com mais de 270 dias em lactação tiveram maior chance de apresentarem MS, principalmente devido ao fato de um maior tempo de exposição favorecer uma infecção intramamária. Foi observada uma mudança de perfil de MS a partir do 13º mês de análise, onde a partir deste ponto, apenas vacas com 270 dias de lactação apresentaram as maiores chances de ocorrência da mesma. Antes do 13º mês do estudo, não havia um padrão, pois foram notadas algumas diferenças no perfil de MS. As vacas de até 90 dias em lactação tiveram menos chance de terem MS ao longo de todo o estudo, enquanto vacas acima de 270 dias foram as que tiveram a maior chance da doença.

Em todo o estudo houve uma relação negativa entre a ocorrência de MS em vacas abaixo de 270 dias de lactação, onde em todas as classes a razão de chance foi de pelo menos 0,5, ou seja, a chance de ocorrência foi de pelo menos 50% menor em relação às vacas com mais de 270 dias de lactação.

Estes dados demonstram que as vacas com número de lactações superior a duas lactações e que estão acima de 270 dias de lactação sofrem mais pressão e consequentemente apresentam as maiores prevalências indicando uma possível mastite subclínica por patógenos contagiosos. Como os patógenos são transmitidos vaca a vaca durante a ordenha, quanto mais tempo permanecem em ordenha maior é o risco de infecção, além do fato de os patógenos contagiosos permanecerem adaptados à glândula mamária não causando um dano agudo (RUEGG, 2012).

O perfil de patógenos isolados de mastite subclínica no rebanho estudado pode ser observado na Figura 13.

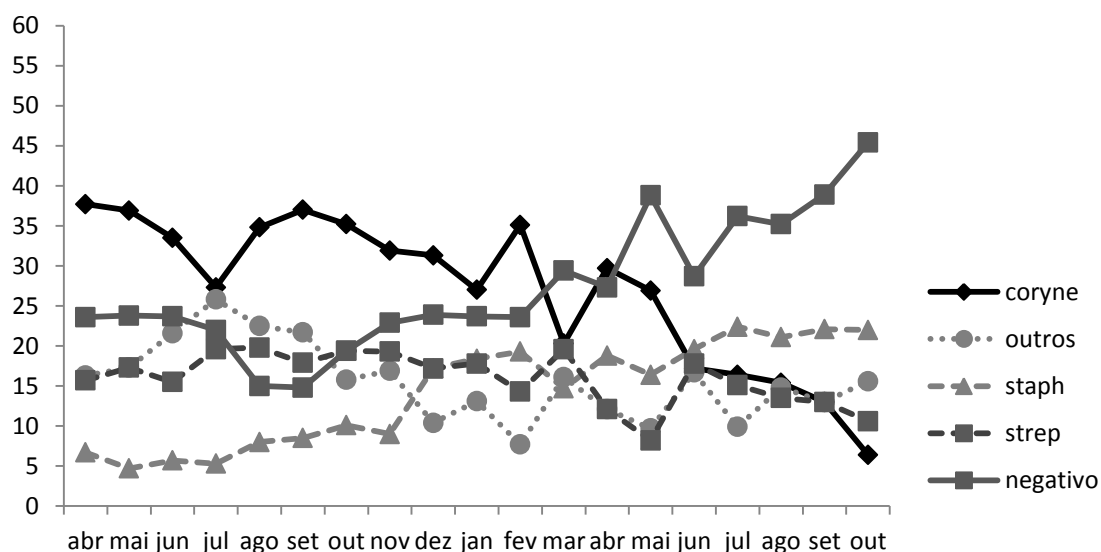


Figura 13. Perfil de patógenos isolados de mastite subclínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015. Coryne = *Corynebacterium* spp.; staph = *Staphylococcus* spp.; strep = *Streptococcus* spp.

O perfil de patógenos causadores de MS sofreu mudanças consideráveis ao longo do estudo. Ao passo que as medidas de pré e pós-dipping, identificação de vacas cronicamente infectadas, segregação de animais com patógenos contagiosos e descarte de animais foram sendo aprimorados, em médio prazo notou-se que *Corynebacterium* spp. foi declinando consideravelmente para seu menor índice no último mês do estudo. Em contrapartida os *Staphylococcus* spp. e cultivos microbiológicos com resultado negativo aumentaram consideravelmente.

5.2.2 Análise estatística para mastite subclínica

Para analisar a interação entre as variáveis mensuradas e a mastite subclínica, foi usado o modelo linear generalizado misto com função de ligação logito, conforme observado na Tabela 6. Como os dados foram mensurados continuamente por 18 meses, foi testada no modelo a interação do resultado pontual de MS com os meses anteriores, porém convergindo apenas quando foram usados no modelo os resultados dos três meses anteriores.

Tabela 6. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite subclínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	0,69	0,20	0,007	-	-
Mês	- 0,35	0,09	< 0,0001*	0,70	- 0,59 – (- 0,84)
P. diária**	- 0,04	0,005	< 0,0001*	0,97	- 0,95 – (- 0,97)
Histórico de MS**					
1 mês antes	1,40	0,01	< 0,0001*	4,06	3,36 – 4,91
2 meses antes	0,86	0,10	< 0,0001*	2,36	1,93 – 2,88
3 meses antes	0,46	0,10	< 0,0001*	1,59	1,30 – 1,93
N. lactação**					
1 lactação	- 1,03	0,11	< 0,0001*	0,36	- 0,28 – (- 0,45)
2 lactações	- 0,24	0,12	0,04*	0,78	- 0,62 – (- 0,99)
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 2,30	0,67	0,0006*	0,10	- 0,02 – (- 0,375)
91 – 180	- 0,59	0,12	< 0,0001*	0,55	- 0,44 – (- 0,70)
181 – 270	- 0,49	0,11	< 0,0001*	0,61	- 0,49 – (- 0,76)
>270	-	-	-	-	-

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MS = mastite subclínica, N. lactação = número de lactação e DIM = dias em lactação.

No parâmetro, histórico de mastite subclínica é importante ressaltar que no modelo linear utilizado, a análise se baseia apenas no momento anteriormente discriminado, ou seja, quando se assume três meses antes significa dizer que leva apenas em consideração o histórico pontual no terceiro mês anterior ao caso, ignorando um mês e dois meses antes. Se uma vaca apresentar mastite subclínica no mês atual o modelo prevê apenas se há três meses ela também estava com mastite subclínica e assim sucessivamente. Outros modelos deverão ser usados levando em consideração uma matriz que contemple a situação consecutiva da mastite subclínica, podendo elucidar melhor que este modelo.

Ao longo de 18 meses do estudo o mês demonstrou uma relação negativa para a ocorrência de MS (estimativa = - 0,32; $p < 0,0001$), ou seja, com o passar dos meses a ocorrência de MS foi diminuindo. Biologicamente a Figura 8 demonstrou que o programa de controle foi eficiente em baixar a prevalência de MS, e em relação ao último mês a prevalência foi de 23,3%, com uma chance de 0,7 vezes para a ocorrência da mesma.

A produção diária de leite por vaca também apresentou uma relação negativa com a ocorrência de MS (estimativa = - 0,04; $p < 0,0001$), porém ao analisar este efeito continuamente no modelo observou-se uma razão de chances próxima a um o que enfraquece tal achado. Intuitivamente este achado demonstra que uma vaca que possui produção diária maior que a média do estudo, que foi de 32,15 L, tem menos chance de estar com MS.

A chance de uma vaca apresentar MS sendo que um mês antes também estivesse doente foram 4,06 (estimativa = 1,40; $p < 0,0001$) vezes maior, 2,36 (estimativa = 0,86; $p < 0,0001$) maior se tivesse apresentado dois meses antes e de 1,59 (estimativa = 0,46; $p < 0,0001$) vez maior se este evento estivesse ocorrido há três meses.

O número de lactações apresentou efeito negativo para ocorrência de MS em vacas de primeira e segunda lactação, sendo que as primíparas apresentaram apenas 0,36 (estimativa = - 1,03; $p < 0,0001$) de chance de ocorrência e as vacas com duas lactações tiveram chance de ocorrência de 0,78 (estimativa = - 0,24; $p = 0,04$).

Os dias em lactação também apresentou efeito negativo para ocorrência de MS. Vacas com até 90 dias de lactação tinham apenas 0,1 (estimativa = - 2,30; $p = 0,0006$) de chance, as que estiveram entre 91 – 180 dias de lactação apresentaram 0,55 (estimativa = - 0,59; $p < 0,0001$) e as que estiveram entre 181 – 270 dias apresentaram 0,61 (estimativa = - 0,49; $p < 0,0001$) em relação àquelas com mais de 270 dias.

Em um rebanho, sabe-se que há uma relação entre a mastite subclínica e a mastite clínica, sendo assim usou-se também o modelo generalizado misto para prever essa interação, calculando o efeito da mastite clínica sobre a mastite subclínica conforme se pode observar na Tabela 7.

Tabela 7. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre mastite subclínica com base nos parâmetros de mastite clínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	2,71	0,24	< 0,0001*	0,73	2,23 – 3,17
Mês	- 0,32	0,08	< 0,0001*	0,073	- 0,47 – (- 0,16)
N. lactação**					
1 lactação	- 1,01	0,11	< 0,0001*	0,40	- 1,21 – (- 0,80)
2 lactações	- 0,23	0,12	0,03	0,79	- 0,44 – (- 0,10)
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 1,08	0,16	< 0,0001*	0,34	- 1,39 – (- 0,76)
91 – 180	- 0,65	0,11	< 0,0001*	0,52	- 0,87 – (- 0,43)
181 – 270	- 0,52	0,11	< 0,0001*	0,59	- 0,74 – (- 0,30)
>270	-	-	-	-	-
P. diária	- 0,04	0,005	< 0,0001*	0,96	- 0,05 – (- 0,03)
Histórico de MC**					
Mesmo mês	- 1,90	0,16	< 0,0001*	0,14	- 0,05 – (- 0,03)
1 mês	- 0,45	0,20	0,02*	0,64	- 2,21 – (- 1,60)
2 meses	- 0,34	0,17	0,05	0,71	- 0,68 – 0,002
3 meses	-	-	-	-	-
Histórico de MS**					
1 mês	-	-	-	-	-
2 meses	0,83	0,12	< 0,0001*	2,29	0,60 – 1,06

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MS = mastite subclínica, N. lactação = número de lactação, DIM = dias em lactação e Histórico de MC = histórico de mastite clínica.

Neste contexto pode-se observar que a ocorrência de MC até dois meses anteriores aos casos de MS apresentou efeito negativo, mas se observar o histórico de MS dois meses antes a chance foi 2,20 (estimativa = 0,83; $p < 0,0001$) vezes maior. Aparentemente isso remete ao fato de que os casos de MC recentes (dois meses anteriores) não tinham relação com a ocorrência de MS.

Ao se observar o histórico de MS dois meses antes a chance foi 2,20 (estimativa = 0,83; $p < 0,0001$) vezes maior para ocorrência de MS. Aparentemente isso remete ao fato de que os casos de MC recentes (dois meses anteriores) não tinham relação com a ocorrência de MS. Estes achados reforçam que a ocorrência de MC não estava associada à ocorrência de MS.

5.3 Mastite Clínica e tratamento antimicrobiano

5.3.1 Análise descritiva

Durante o estudo a prevalência e incidência de mastite clínica por animal se mantiveram constantes, indicando o desafio para o controle (Figura 14). A prevalência média de MC ao longo do estudo foi de 11,11% (2,7%) e a incidência média foi de 7,6% (2,8%).

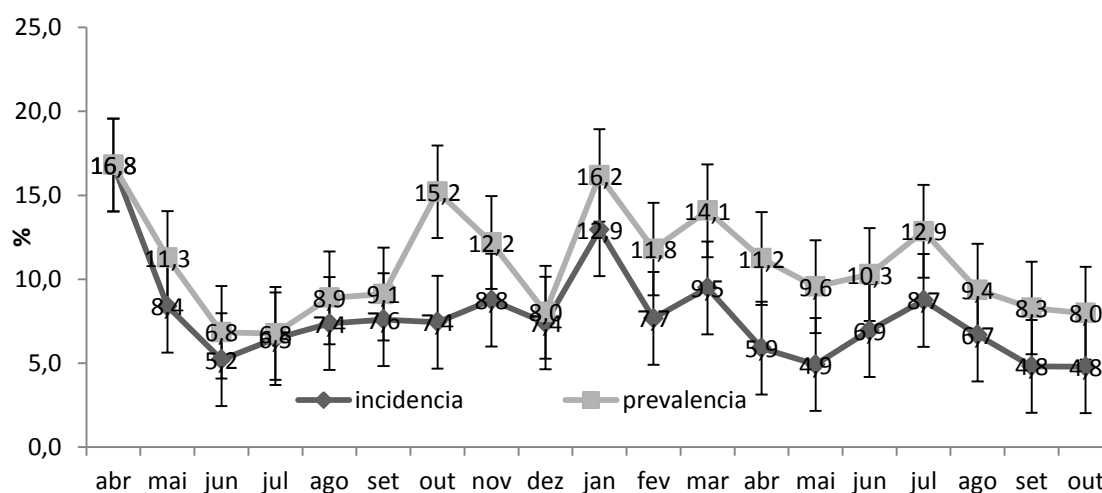


Figura 14. Incidência e prevalência de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite durante o período do estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 704 casos de MC, 70,9% (499/704) foram primários (incidência), 20,5% (144/704) do segundo caso no mesmo teto na mesma lactação, 7,2% (51/704) correspondente ao terceiro caso no mesmo teto na mesma lactação e 1,4% (10/704) referente ao quarto caso do mesmo teto na mesma lactação (Figura 15).

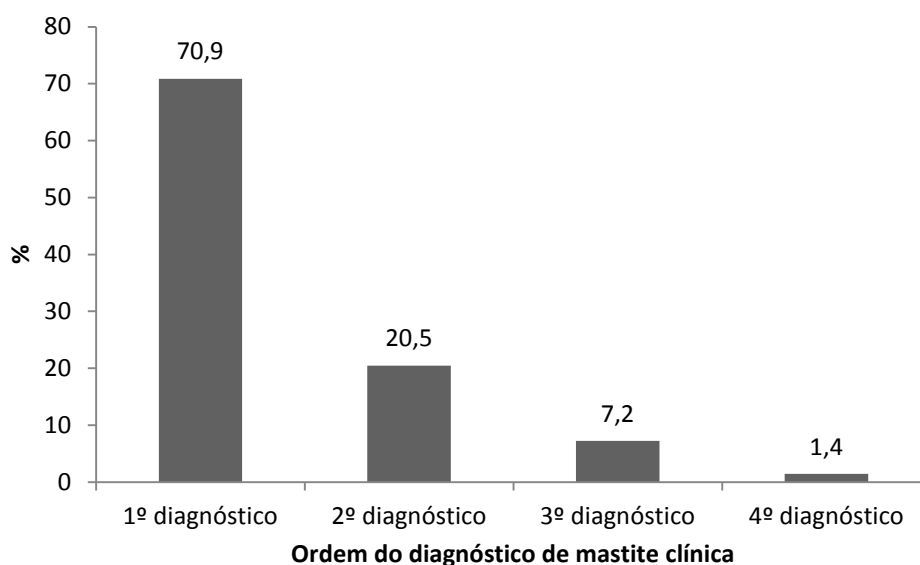


Figura 15. Distribuição do total de 704 casos de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 704 casos, 68,9% (485/704) puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica, por ter sido coletada a segunda amostra, 51,3% (249/485) demonstraram o sucesso na terapia (curaram), 49,7% (236/485) demonstraram o insucesso na terapia de MC e repetiram o mesmo patógeno (Figura 16).

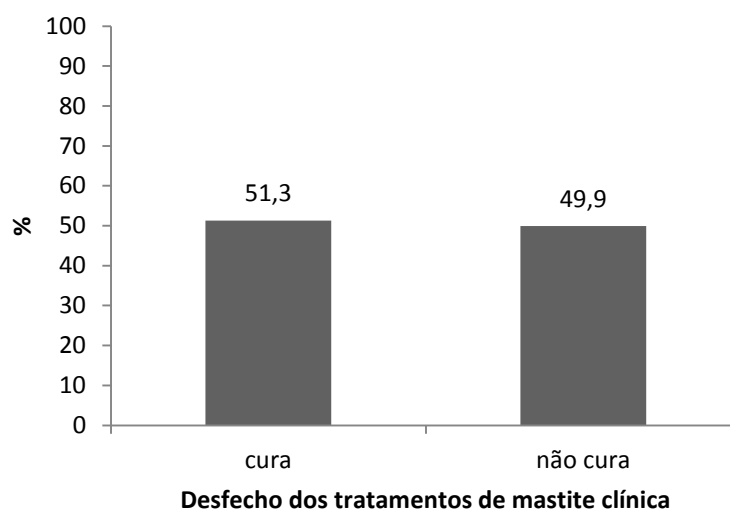


Figura 16. Resultado do tratamento de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite ao longo do estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 485 casos avaliados, 71,9% (349/485), 19% (92/485), 7,4% (36/485) e 1,6% (8/485) eram, respectivamente, referentes ao primeiro, segundo, terceiro e quarto casos de mastite clínica no mesmo teto.

De acordo com a ordem de cada caso de mastite clínica as taxas de insucesso do tratamento de MC foram de 44,1% (154/349), 55,4% (51/92), 69,5% (25/36) e 85,7% (6/8), respectivamente para o primeiro, segundo, terceiro e quarto caso no mesmo teto e na mesma lactação (Figura 17).

Do total de 236 casos de insucesso ao tratamento antimicrobiano de mastite clínica 65,25% (154/236) eram referentes ao primeiro caso, 21,61% (51/236) ao segundo caso de mastite clínica, 10,6% (25/236) ao terceiro caso de mastite clínica e 2,6% (6/236) ao quarto caso de mastite clínica.

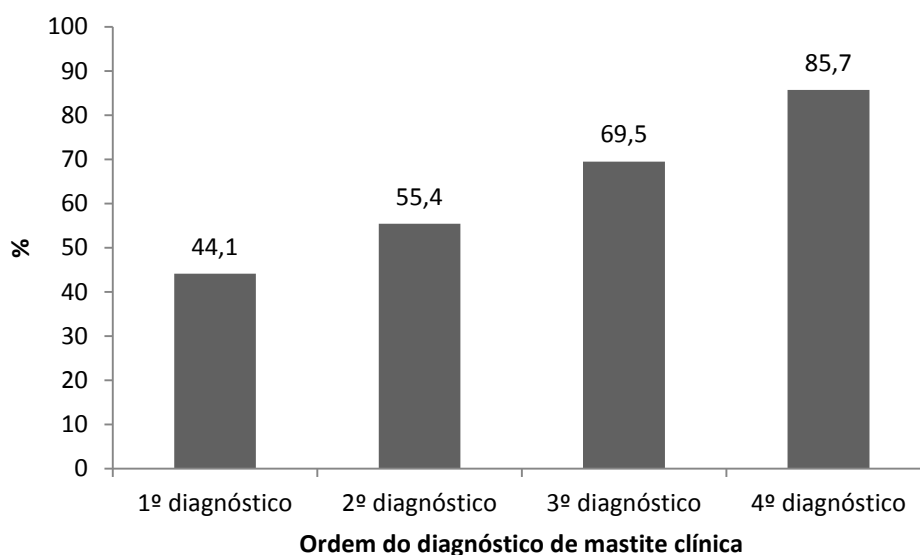


Figura 17. Distribuição de casos de insucesso no tratamento da mastite clínica de acordo com a ordem de ocorrência dos casos de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 485 casos 16,9% (82/485), 71,5% (347/485) e 11,5% (56/485) eram referentes aos graus de severidade um, dois e três, respectivamente. Destes, ocorreram insucesso ao tratamento antimicrobiano de MC em 53,65% (44/82), 47,5% (165/347) e 48,21% 27/56 ao grau de severidade um, dois e três, respectivamente (Figura 18).

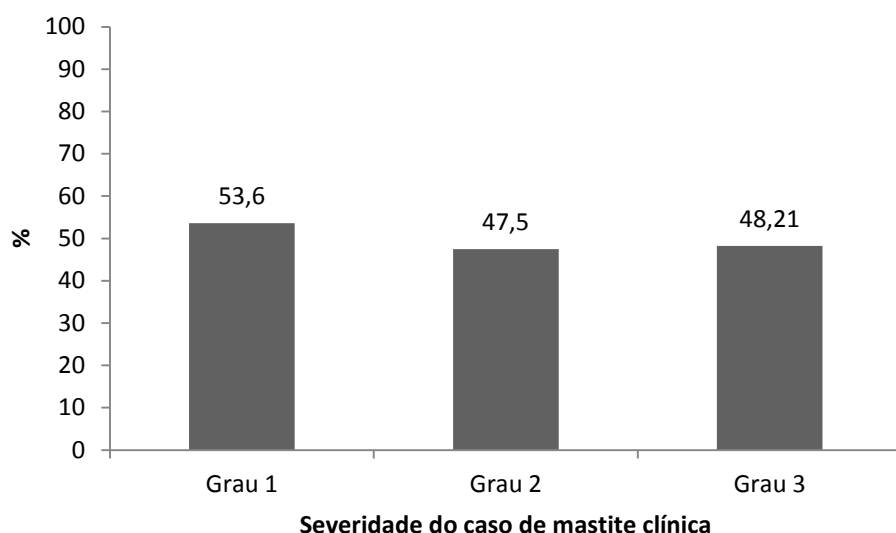


Figura 18. Insucesso no tratamento de mastite clínica em relação ao grau severidade do caso de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 485 casos de mastite clínica avaliados, partindo-se do patógeno envolvido e avaliando o percentual de insucesso ao tratamento antimicrobiano, nota-se uma alta taxa quando os patógenos causadores eram os contagiosos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e pela *Pasteurella* spp. Entre os que obtiveram mais sucesso de cura destacam-se as *Enterobacteriaceae* e os estafilococos coagulase-negativa (Figura 19).

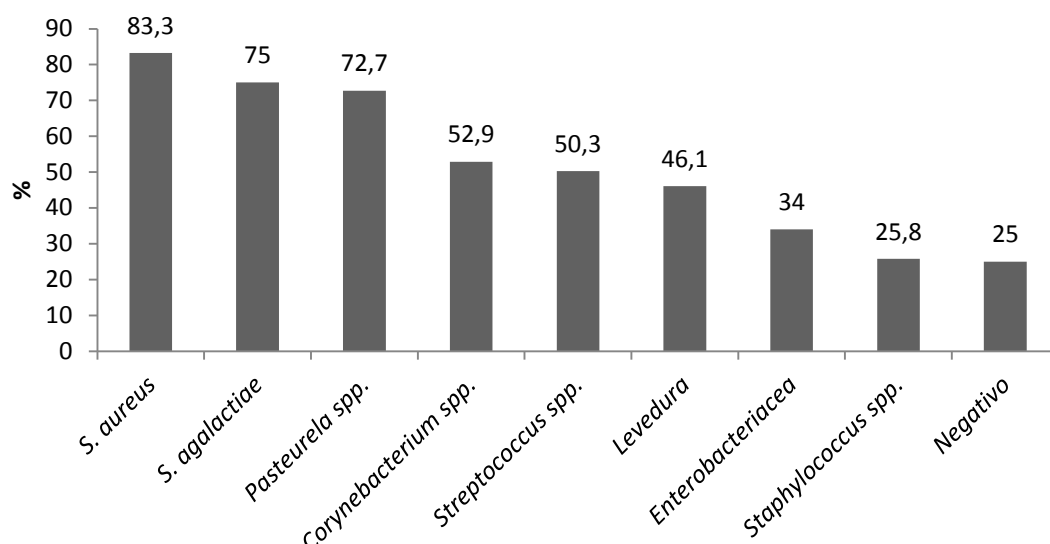


Figura 19. Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica em vacas Holandesas em relação ao resultado do cultivo microbiológico. Botucatu, São Paulo, 2015.

Ao avaliar o perfil de distribuição do grau de severidade em relação ao patógeno isolado, nota-se que o grau de severidade dois foi o mais frequente, porém ao analisar quais patógenos foram implicados neste grau de severidade não houve um parâmetro estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Já para o grau de severidade um, observou-se mais isolamento dos contagiosos *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp., porém também sem significância estatística ($p > 0,05$). No grau de severidade três, observou-se maior isolamento de enterobactérias, contudo sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 20).

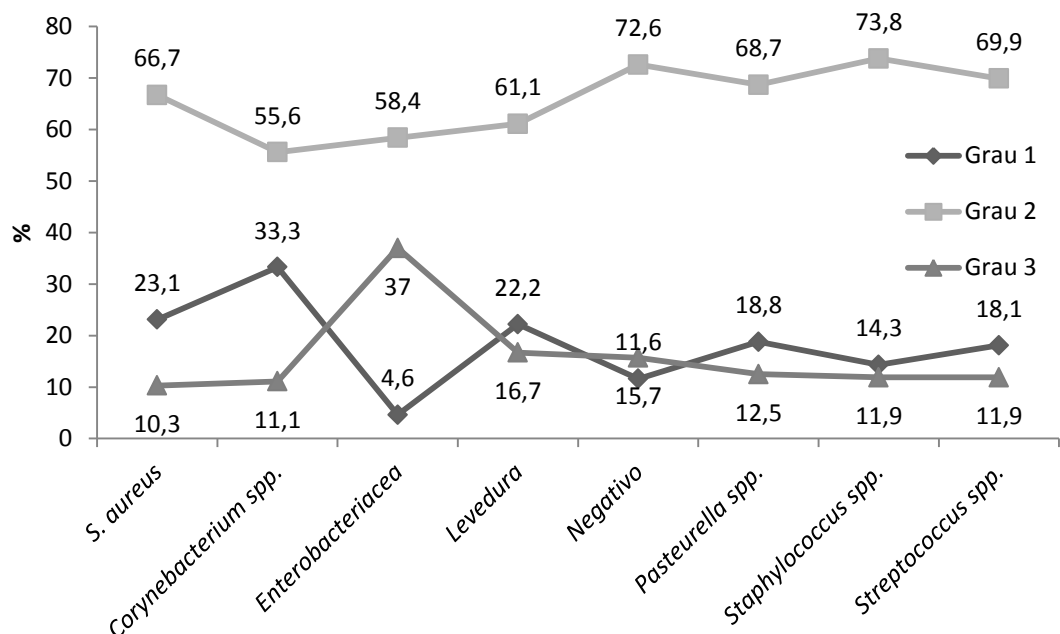


Figura 20. Relação entre a severidade de casos de mastite clínica em vacas Holandesas e o resultado do cultivo microbiológico. Botucatu, São Paulo, 2015.

A Figura 21 ilustra quais antimicrobianos apresentaram a maior frequência de insucesso ao tratamento antimicrobiano de casos de MC. Onde o 1 representa a tilosina na concentração de 20 mg/dose; o 2 representa a formulação à base de tetraciclina na concentração de 200 mg/dose, neomicina na concentração de 250 mg/dose, bacitracina na concentração de 28 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose; o 3 representa a gentamicina na concentração de 250 mg/dose; o 4 representa o cefaperazone sódico na concentração de 250 mg/dose; o 5 representa a formulação à base de cefalexina na concentração de 100 mg/dose, neomicina na concentração de 100 mg/dose, miconazol na concentração de 200 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose; o 6 representa o cloridrato de ceftiofur na concentração de 125 mg/dose; e o 7 representa o sulfato de cefquinoma na concentração de 88 mg/dose.

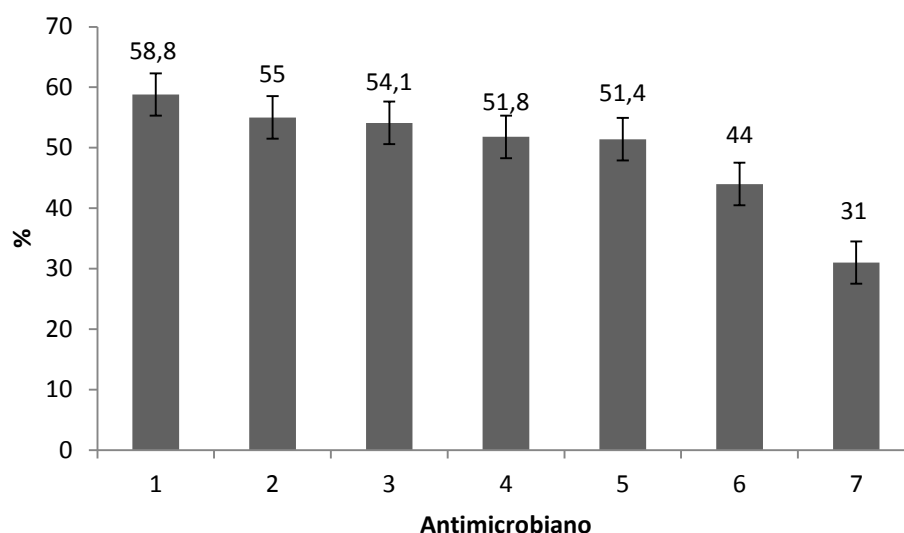


Figura 21. Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica de vacas Holandesas em relação ao medicamento utilizado. Botucatu, São Paulo, 2015.

Do total de 485 tratamentos de mastite clínica em 19,4% (94/485) correspondeu ao tratamento com antimicrobiano intramamário e intravenoso ou intramuscular que foi denominado de tratamento associado. Em 80,6% (391/485) dos casos foi usado apenas o antimicrobiano intramamário (tópico). O insucesso terapêutico de casos de MC ocorreu 46,8% (44/94) e 49,1% (192/391), nos casos de tratamento associado e intramamário (tópico), respectivamente (Figura 22).

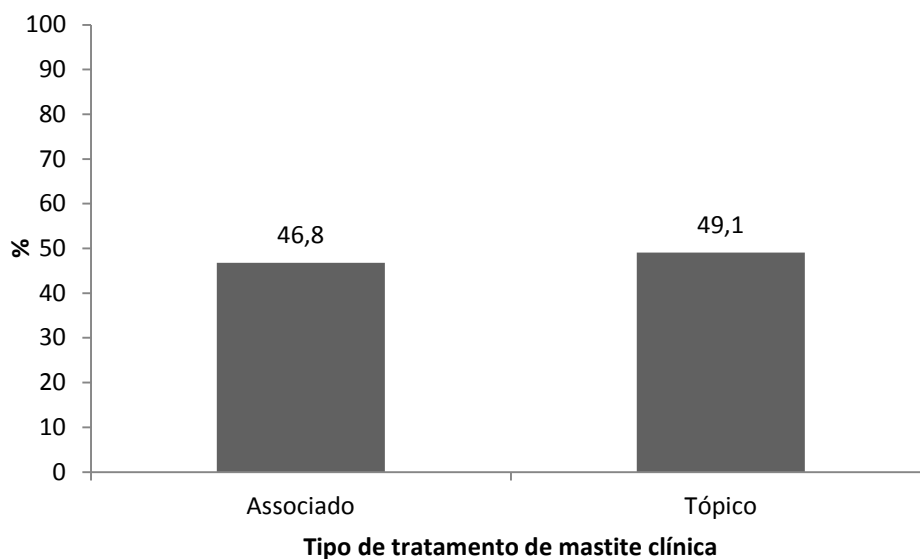


Figura 22. Insucesso do tratamento antimicrobiano de casos de mastite clínica em relação ao tipo de tratamento em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

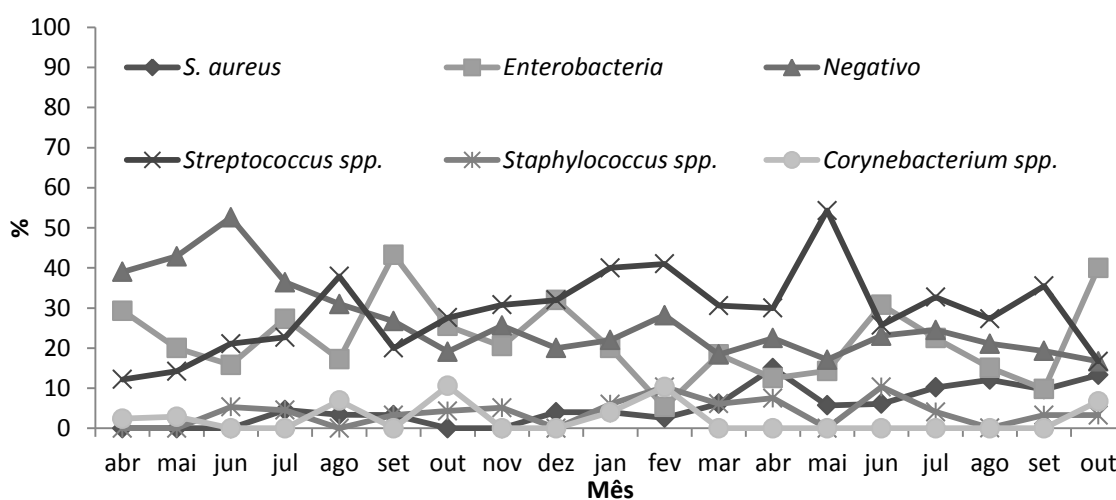


Figura 23. Frequência do resultado do cultivo microbiológico de casos de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Em relação à epidemiologia da MC ao longo do estudo, nota-se que vacas entre 31-180 dias de lactação de primeira e terceira lactação apresentaram maiores taxas de mastite clínica (Figura 24 e Figura 25, respectivamente).

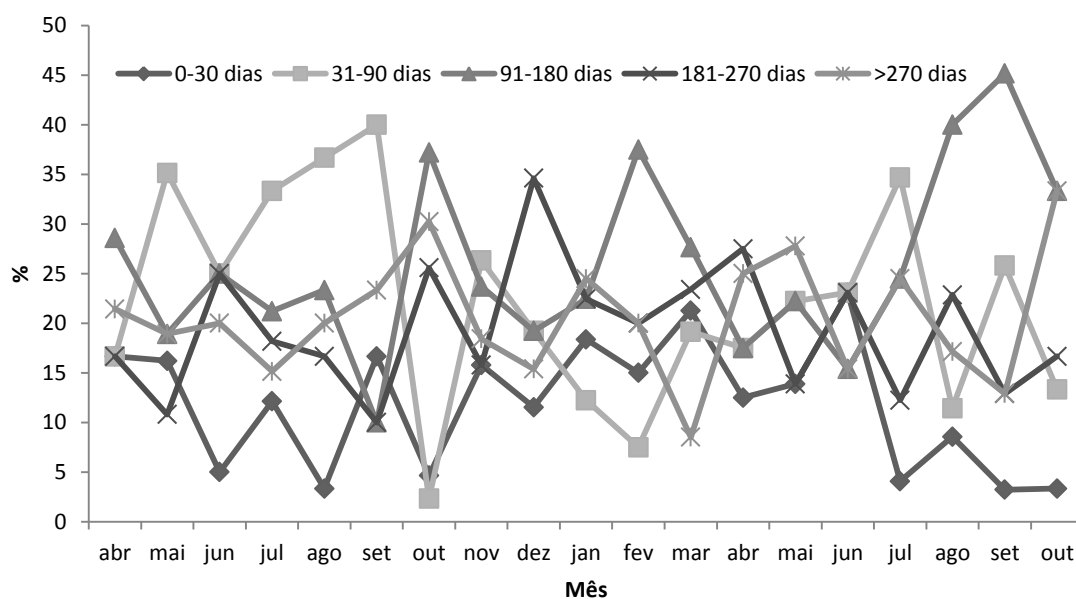


Figura 24. Relação entre os dias em lactação e a frequência de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

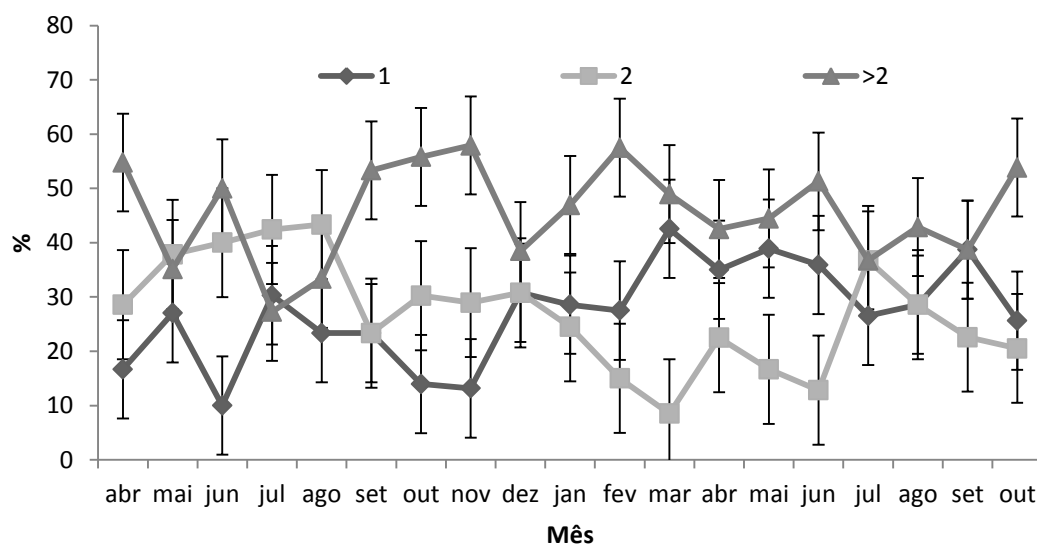


Figura 25. Relação entre o número de lactações e a frequência de mastite clínica em vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

5.3.2 Análise estatística

Para medir a interação entre as variáveis mensuradas e a mastite clínica, foi usado o modelo linear generalizado misto com função de ligação logito, conforme observado na Tabela 8. Como os dados foram mensurados continuamente por 18 meses, foi testada no modelo a interação do resultado pontual de mastite clínica com os meses anteriores, porém convergindo apenas quando foram usados no modelo os resultados de até três meses anteriores, assim como ocorreu para a análise de mastite subclínica. A produção diária por vaca foi suprimida por não convergir no modelo, principalmente porque vacas em tratamento de MC clínica não tem o leite retirado para consumo, sendo este descartado.

Tabela 8. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite clínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	- 2,64	0,16	< 0,0001*	-	- 2,98 – (- 2,31)
Mês	0,16	0,12	0,18	1,18	- 0,08 – 0,41
P. diária**	-	-	-	-	-
N. lactação**					
1 lactação	- 0,57	0,16	0,0003*	0,56	- 0,90 – (- 0,26)
2 lactações	- 0,10	0,16	0,54	0,91	- 0,41 – 0,22
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 0,30	0,76	0,69	0,74	- 1,80 – 1,20
91 – 180	0,34	0,16	0,03*	1,40	0,02 – 0,66
181 – 270	0,22	0,17	0,19	1,24	- 0,11 – 0,55
>270	-	-	-	-	-
Histórico de MC**					
1 mês antes	0,78	0,17	< 0,0001*	2,18	0,44 – 1,11

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
2 meses antes	0,05	0,20	0,80	1,05	- 0,34 – 0,44
3 meses antes	0,64	0,17	0,0002*	1,88	0,30 – 0,97

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MC = mastite Clínica, N. lactação = número de lactação e DIM = dias em lactação.

O fator mês, diferentemente do que ocorreu com a MS, demonstrou uma relação positiva com a ocorrência de MC, mas sem significância estatística (estimativa = 0,16; $p = 0,18$). A chance das vacas desenvolverem MC ao longo dos meses foi de 1,18.

O número de lactações apresentou uma relação negativa com a ocorrência de MC, sendo nas vacas de primeira lactação estatisticamente significativo em relação as vacas de segunda ou mais lactações (estimativa = - 0,57; $p = 0,0003$). As vacas de segunda lactação também demonstraram efeito negativo para ocorrência de MC, porém não tendo significância estatística (estimativa = - 0,10; $p = 0,54$) e tendo quase a mesma chance (RC = 0,91) quando comparadas com as vacas acima de duas lactações.

Quando se analisa os dias em lactação também ocorreram diferenças com os achados da MS. Vacas com até 90 dias em lactação apresentaram efeito negativo para a ocorrência de MC, porém não tendo significância estatística (estimativa = 0,30; $p = 0,74$). Vacas entre 91 – 180 dias em lactação apresentaram uma relação positiva e estatisticamente significativa para a ocorrência de MC (estimativa = 0,34; $p = 0,03$), demonstrando 1,40 vez mais chance que as vacas acima de 270 dias. Vacas entre 181 – 270 dias em lactação também demonstraram efeito positivo para a ocorrência de MC, porém sem significância estatística (estimativa = 0,22; $p = 0,19$).

Analizando todos os casos de MC e observando os históricos das mesmas um, dois e três meses antes, ocorreram 21,43% (96/448), 14,21% (55/387) e 18,10% (61/337) casos de MC, respectivamente, portanto sem diferença estatisticamente significante. Ocorreu efeito positivo entre a ocorrência de MC e a presença de MC um mês antes (estimativa = 0,78; $p < 0,0001$), onde ocorreram 2,18 vezes mais chances de desenvolver uma MC dado que no mês anterior também tenha ocorrido. Houve efeito positivo também ao analisar dois meses anteriores, porém sem significância estatística (estimativa = 0,05; $p = 0,80$). O mesmo ocorreu ao se analisar o histórico de MC três

meses anteriores (estimativa = 0,64; $p = 0,0002$), apresentando 1,88 vez mais chances de apresentar MC.

No parâmetro histórico de mastite clínica é importante ressaltar que no modelo linear a análise se baseia apenas no momento anteriormente discriminado, ou seja, quando se assume três meses antes significa dizer que leva apenas em consideração o histórico pontual no terceiro mês anterior ao caso, ignorando um mês e dois meses antes. Se uma vaca apresentar mastite clínica no mês atual o modelo prevê apenas se há três meses ela também estava com mastite clínica e assim sucessivamente.

Em um rebanho, sabe-se que há uma relação entre a mastite clínica e a mastite subclínica, sendo assim usou-se também o modelo generalizado misto para prever essa interação, calculando-se o efeito da mastite subclínica sobre a mastite clínica conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre mastite clínica com base nos parâmetros de mastite subclínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	- 3,02	0,29	< 0,0001*	-	- 3,60 – (- 2,43)
Mês	0,24	0,12	0,06	1,27	- 0,01 – 0,49
P. diária	- 0,01	0,01	0,47	0,99	- 0,02 – 0,01
N. lactação**					
1 lactação	- 0,41	0,16	0,01*	0,66	- 0,73 – (- 0,08)
2 lactações	- 0,03	0,16	0,86	0,97	- 0,35 – 0,28
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 0,02	0,76	0,97	0,98	- 1,52 – 1,47
91 – 180	0,56	0,18	0,002*	1,75	0,21 – 0,92
181 – 270	0,37	0,17	0,03*	1,44	0,03 – 0,72
>270	-	-	-	-	-

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Histórico de MC**					
1 meses	0,69	0,17	< 0,0001*	2,00	0,35 – 1,03
2 meses	0,01	0,20	0,94	1,01	- 0,38 – 0,42
3 meses	0,61	0,17	0,0004*	1,85	0,27 – 0,95
Histórico de MS**					
1 mês	0,77	0,15	< 0,0001*	2,16	0,47 – 1,07
2 meses	- 0,05	0,15	0,75	0,95	- 0,35 – 0,25

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MS = mastite subclínica, N. lactação = número de lactação, DIM = dias em lactação e Histórico de MC = histórico de mastite clínica.

O efeito da MS na MC é evidenciado em vacas acima de duas lactações que, acima dos 90 dias (estimativa = 0,56; $p = 0,02$), com histórico de MC um mês (estimativa = 0,69; $p < 0,0001$) e três meses antes (estimativa = 0,61; $p = 0,0004$) e com histórico de MS um mês antes. Vacas com MS no mês anterior têm 2,16 (estimativa = 0,77; $p < 0,0001$) mais chances de desenvolverem MC, bem como vacas com MC um mês antes apresentam duas vezes mais chances (estimativa = 0,69; $p < 0,0001$) de desenvolverem MC.

Estes achados demonstram que a MS certamente levou à MC, principalmente quando se observam fatores de riscos como vacas acima de duas lactações, acima de 90 dias em lactação, com histórico de MC e com MS um mês antes. Estes dados podem ajudar a montar listas de vacas a serem analisadas a cada ordenha, podendo prever a ocorrência de MC. Este achado pode futuramente ser usado em softwares leiteiros para apontar que vacas poderão sofrer uma inspeção mais apurada.

Para medir a interação entre as variáveis mensuradas e o insucesso no tratamento antimicrobiano da mastite clínica, foi usado o modelo linear generalizado misto com função de ligação logito. Nessa interação foi mensurada com a ordem do caso de MC; mês; duração do tratamento; tratamento associado ou não; a severidade do caso; dias em lactação; número de lactações; medicamento e micro-organismo isolados (Tabela 10).

Tabela 10. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para a interação entre o insucesso no tratamento antimicrobiano de mastite clínica em vacas Holandesas e as variáveis observadas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC	IC
Intercepto	1,99	2,06	0,33	7,32	-
Caso					
1	- 1,69	1,21	0,19	0,18	- 4,01 – 0,81
2	- 1,14	1,21	0,34	0,32	- 3,56 – 1,28
3	- 0,21	1,27	0,86	0,81	- 2,75 – 2,33
4	-	-	-	-	-
Micro-organismo isolado					
Classe 1	2,64	0,70	0,0004	14,01	1,22 – 4,05
Classe 2	0,58	0,30	0,06	1,79	- 0,01 – 1,18
Classe 3	0,14	0,35	0,68	1,15	- 0,56 – 0,85
Classe 4	0,55	0,74	0,46	1,73	- 0,93 – 2,03
Classe 5	0,76	0,62	0,22	2,14	0,48 – 2,00
Classe 6	-	-	-	-	-
Duração do tratamento	- 0,24	0,26	0,36	0,79	- 0,77 – 0,28
Tipo de tratamento					
Intramamário	0,15	0,36	0,67	1,16	- 0,57 – 0,87
Associado	-	-	-	-	-
Severidade					
Grau 1	- 0,26	0,54	0,62	0,77	- 1,35 – 0,82
Grau 2	- 0,39	0,44	0,37	0,54	- 1,27 – 0,48
Grau 3	-	-	-	-	-
DIM**					
0 – 30	0,03	0,47	0,94	1,03	- 0,91 – 0,97
31 – 90	- 0,04	0,41	0,92	0,96	- 0,87 – 0,79
91 – 180	- 0,26	0,50	0,50	0,77	- 1,06 – 0,53
181 – 270	- 0,62	0,42	0,14	0,54	- 1,48 – 0,22
>270	-	-	-	-	-
N. lactação					
1	- 0,25	0,30	0,41	0,78	- 0,86 – 0,35
2	0,13	0,31	0,66	1,14	- 0,48 – 0,76
>2	-	-	-	-	-
Medicamento					
Classe 1	0,91	0,61	0,14	2,48	- 0,32 – 2,14
Classe 2	0,35	0,83	0,67	1,42	- 1,31 – 2,02
Classe 3	1,17	0,93	0,21	3,22	- 0,69 – 3,04
Classe 4	1,35	0,72	0,06	3,86	- 0,08 – 2,79

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC	IC
Classe 5	- 0,22	0,91	0,80	0,80	- 2,04 – 1,59
Classe 6	1,60	0,81	0,06	4,95	- 0,01 – 3,21
Classe 7	0,86	0,75	0,25	2,36	- 0,63 – 2,37
Classe 8	-	-	-	-	-

Observou-se uma relação negativa, porém sem significância estatística entre a ordem do caso, se um, dois ou três com o quarto caso de MC e o insucesso no tratamento. Essa relação só não foi mais forte devido ao pequeno número de casos observados como quarto diagnóstico, porém ressalta a importância biológica do insucesso do tratamento em relação ao número de casos repetidos de MC. A chance de insucesso no tratamento antimicrobiano da MC foi de 0,18, 0,32 e 0,81 vezes para o primeiro, segundo e terceiro caso, respectivamente quando comparado ao quarto caso repetido de MC na mesma glândula mamária durante a mesma lactação.

Foi igualmente observada uma relação negativa entre o insucesso na terapia antimicrobiana de MC com a duração do tratamento, porém sem significância estatística (estimativa = - 0,24; $p = 0,36$), reforçando que um tratamento mais prolongado, biologicamente aumentam as chances de sucesso, porém isso acarretará maior custo na produção leiteira.

Notou-se uma relação positiva, porém sem significância estatística, entre o insucesso na terapia antimicrobiana de MC e o tratamento intramamário (tópico) (estimativa = 0,15; $p = 0,67$). Vacas com tratamento intramamário de MC, tiveram 1,16 vezes mais chances de insucesso que àquelas com tratamento associado, certamente uma relação fraca que não justifica devido ao custo do tratamento associado ser mais elevado.

Os fatores intrínsecos individuais como dias em lactação e número de lactações não demonstraram grande importância para o insucesso no tratamento de MC.

Houve uma relação negativa entre o grau de severidade de MC e o insucesso do tratamento de MC, porém sem significância estatística. A chance de insucesso foi de 0,77 e 0,54 para os graus um e dois, respectivamente quando comparado com o grau três. Este achado vai contra a distribuição de frequência observada na Figura 18, pois para cada caso de insucesso no tratamento de MC de severidade três, há 0,77 e 0,54 caso para os graus de severidade um e dois, respectivamente, comprovando que quadros de MC grave são biologicamente mais difíceis de sucesso no tratamento de MC.

Notou-se uma relação positiva com uma tendência estatística entre o

medicamento classe 6 (de tilosina na concentração 20 mg/dose e propilenoglicol) (estimativa = 1,60; $p = 0,06$) e o insucesso no tratamento de MC. A classe 6 de medicamento demonstrou 4,96 vezes mais chance de insucesso ao tratamento de MC em comparação aqueles casos sem tratamento. Também foi observada uma relação positiva com uma tendência estatística entre o medicamento classe 4 (cefoperazone sódico na concentração de 250 mg/dose) (estimativa = 1,35; $p = 0,06$) e o insucesso no tratamento de MC com 3,86 vezes mais chance quando comparado com aqueles casos sem tratamento.

Em contrapartida houve uma tendência negativa, porém sem significância estatística, entre o medicamento classe 5 (de tetraciclina na concentração de 200 mg/dose, neomicina na concentração de 250 mg/dose, bacitracina na concentração de 28 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose) (estimativa = - 0,22; $p = 0,80$) e a ocorrência de insucesso no tratamento de MC.

A duas variáveis que foram estatisticamente significativas para o insucesso no tratamento antimicrobiano, as quais foram acusadas pelo modelo, foram apenas a ordem do caso ($p = 0,02$) e os micro-organismos ($p = 0,01$) implicados nos casos de MC (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para o insucesso no tratamento da mastite clínica com base no micro-organismo isolado e a ordem do caso de mastite clínica de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	1,29	1,14	0,29	-	- 1,07 – 3,46
Caso de MC**					
1	- 1,93	1, 13	0,09	0,15	- 4,17 – 0,31
2	- 1,47	1,14	0,20	0,23	- 3,74 – 0,79
3	- 0,90	1,19	0,44	0,41	- 3,26 – 1,45
4	-	-	-	-	-
Micro-organismo isolado					
1	2,43	0,59	< 0,0001*	11,36	1,26 – 3,61
2	0,55	0,25	0,03*	1,73	0,04 – 1,05
3	0,28	0,30	0,37	1,32	- 0,33 – 0,98
4	0,45	0,62	0,46	1,57	- 0,78 – 1,69
5	1,10	0,51	0,03*	3,00	- 0,08 – 2,13
6	-	-	-	-	-

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, MC = mastite clínica.

Como observado na Figura 17, padrões de insucesso no tratamento antimicrobiano de MC em relação à ordem do caso mostraram que o quarto caso de MC na mesma glândula mamária representou 85,7% de insucesso. Dessa maneira, o primeiro, o segundo e o terceiro casos demonstraram uma relação negativa com o insucesso no tratamento da MC, porém em nenhum deles isso mostrou ter significância estatística, ocorrendo apenas uma tendência para o primeiro caso (estimativa = - 1,93; $p = 0,09$), com 0,15 de chance de insucesso no tratamento em relação ao quarto caso na mesma glândula mamária.

Quando foram isolados dos casos de MC o *Staphylococcus aureus* ou o *Streptococcus agalactiae* a chance de insucesso no tratamento antimicrobiano foi 11,36 vezes maior (estimativa = 2,43; $p = 0,0001$). Quando foram isolados *Staphylococcus* coagulante-negativa, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus* spp. do grupo D,

Pasteurella spp., *Prototeca* spp., *Trueperella pyogenes*, bacilos gram positivos irregulares ou grupo dos outros actinomicetales a chance de insucesso no tratamento da MC foi estatisticamente significativo (estimativa = 0,55; $p = 0,03$) com uma magnitude de 1,73. Quando o resultado do cultivo microbiológico apresentou-se contaminado a chance de insucesso no tratamento da MC aumentou estatisticamente significativa em 3,00 vezes (estimativa = 1,10; $p = 0,03$).

A magnitude da resposta da MC (severidade) demonstrou uma relação negativa entre MC e o insucesso do tratamento antimicrobiano, porém sem significância estatística. O tratamento intramamário (tópico) apresentou relação positiva para insucesso no tratamento de MC, porém também sem significância estatística ($p = 0,67$). O tratamento com a formulação à base de tetraciclina na concentração de 200 mg/dose, neomicina na concentração de 250 mg/dose, bacitracina na concentração de 28 mg/dose e prednisolona na concentração de 10 mg/dose foi o único que apresentou relação negativa para o insucesso no tratamento, porém sem significância estatística ($p = 0,80$).

5.4 Modelagem matemática para a infecção subclínica causada pelo *Corynebacterium* spp.

Na Tabela 12 estão colocados os valores estimados para os parâmetros β_1 , β_2 , ϵ , τ e ρ após o início do controle (a estimativa para estes parâmetros antes do controle também foi feita, porém os resultados não diferiram significativamente dos obtidos após o início do controle). Os resultados obtidos são a média de 20 simulações do algoritmo genético (AG).

Tabela 12. Parâmetros estimados pelo algoritmo genético da modelagem para a infecção subclínica causada pelo *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

-	β_1	β_2	ϵ	ρ	τ
melhor	0,7663	0,96	0,97984	0,00005	1,098
média	$0,7670 \pm 0,0009$	$1,02 \pm 0,02$	$0,97962 \pm 0,00008$	$0,00013 \pm 0,00004$	$1,094 \pm 0,001$

Na Figura 26 observa-se a evolução temporal das populações antes e após o início do controle. Os círculos são as medidas feitas em campo e as curvas são as simulações obtidas com o melhor conjunto de parâmetros obtido pelo AG e listadas na Tabela 13.

Na Figura 27 observa-se como varia o resíduo quando se utiliza um dos parâmetros diferente dos obtidos pelo processo de otimização. Em cada caso, variou-se propositalmente um dos parâmetros do conjunto de parâmetros obtido no processo de otimização e foi mantido os demais constantes. Pode-se observar que o menor resíduo em cada caso corresponde ao valor ótimo do parâmetro que está variando. Não está mostrado o resultado obtido para β_2 e ρ pois para estes o resíduo não muda quando variados.

A pouca sensibilidade do resíduo com relação a β_2 se deve provavelmente ao fato de que ϵ é da ordem de 1, ou seja, os indivíduos recuperados se tomam suscetíveis muito rapidamente e portanto participam muito pouco da dinâmica da transmissão. Já ρ assume valores pequenos, o que é explicado pelo fato dessa bactéria ser muito sensível ao tratamento com antimicrobianos, e por isso mesmo o resíduo não muda muito quando é variado.

Com relação a análise de sensibilidade (Tabelas 12 e 13) tem-se que o modelo é mais sensível (maior variância) aos parâmetros γ_1 , γ_2 , ϕ_1 e μ_2 . Na análise de sensibilidade, cada um dos parâmetros foi variado, enquanto os demais foram mantidos fixos, aleatoriamente, 50% para mais ou para menos. Como os parâmetros dependem do tempo, isto foi feito a cada passo de tempo, neste caso, a cada mês. Esta análise foi feita apenas com os casos da fase de controle, que durou os cinco primeiros meses do estudo.

A Figura 28 mostra a evolução temporal da incidência e da prevalência da doença com ou sem o controle. Para efeito de comparação os dados experimentais, em círculo, também estão mostrados. Em verde o resultado obtido pela simulação (melhor amostra) a qual foi permitido estimar os parâmetros β_1 , β_2 , ϵ , τ e ρ . Em laranja o resultado obtido também por simulação considerando o caso sem controle. Esta curva foi gerada com os valores de β_1 , β_2 , ϵ , τ e ρ obtidos pelo AG (caso com controle) e com os valores médios dos demais parâmetros antes do controle mostrado na Tabela 3, visto que não se tem dados sem controle para tempos grandes. Observa-se que as medidas de controle foram importantes para diminuir a prevalência e a incidência na população.

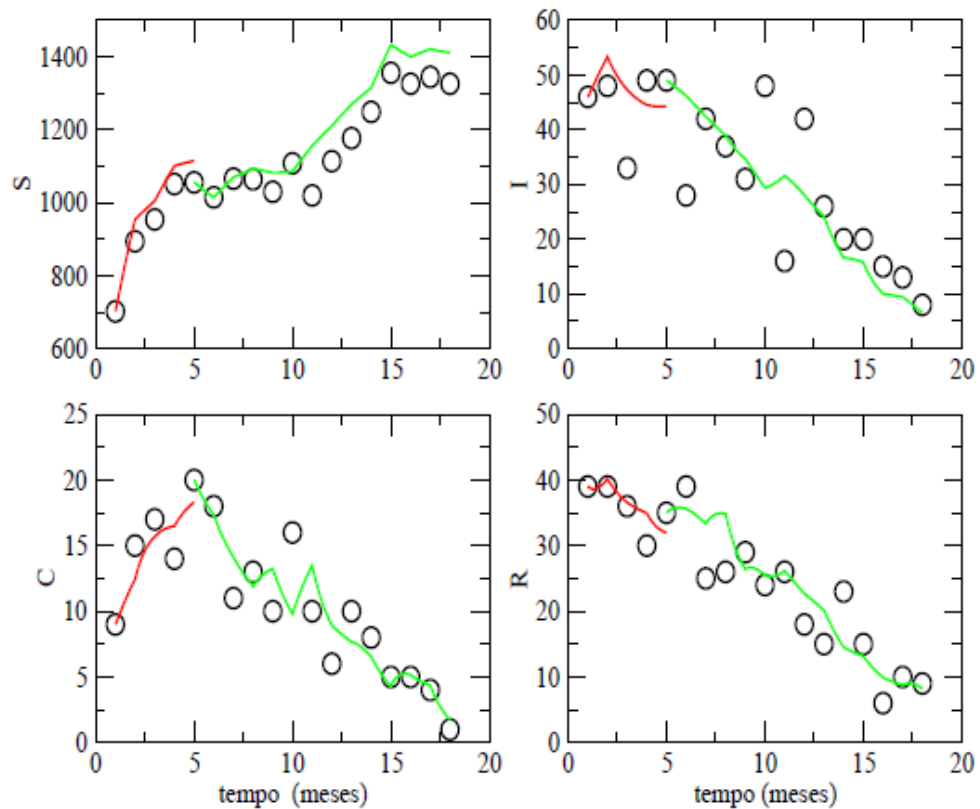


Figura 26. Evolução temporal das populações de quartos mamários infectados com *Corynebacterim* spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Tabela 13. Análise de sensibilidade do modelo matemático para a infecção subclínica causada por *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

-	μ_1	μ_2	μ_3	μ_4
β_1	0.776 ± 0.003	0.80 ± 0.01	0.764 ± 0.005	0.786 ± 0.003
β_2	1.09 ± 0.09	0.40 ± 0.08	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1
ϵ	0.9791 ± 0.0001	0.9788 ± 0.0004	0.9792 ± 0.0001	0.97906 ± 0.00004
ρ	0.00036 ± 0.00004	0.0008 ± 0.0003	0.00035 ± 0.00005	0.00024 ± 0.00003
τ	1.072 ± 0.003	1.047 ± 0.009	1.083 ± 0.002	1.076 ± 0.003

Tabela 14. Análise de sensibilidade do modelo matemático para a infecção subclínica causada por *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

-	γ_1	γ_2	θ	ϕ_1	ϕ_2
β_1	0.68 ± 0.03	0.775 ± 0.005	0.751 ± 0.004	0.61 ± 0.02	0.795 ± 0.001
β_2	0.07 ± 0.02	0.5 ± 0.4	1.8 ± 0.3	6.1 ± 0.6	0.99 ± 0.03
ϵ	0.95 ± 0.02	0.977 ± 0.002	0.9784 ± 0.0004	0.78 ± 0.06	0.97928 ± 0.00006
ρ	0.0134 ± 0.004	0.004 ± 0.003	0.0008 ± 0.0002	0.16 ± 0.03	0.00027 ± 0.00005
τ	1.04 ± 0.01	1.03 ± 0.03	1.088 ± 0.002	1.061 ± 0.008	1.076 ± 0.001

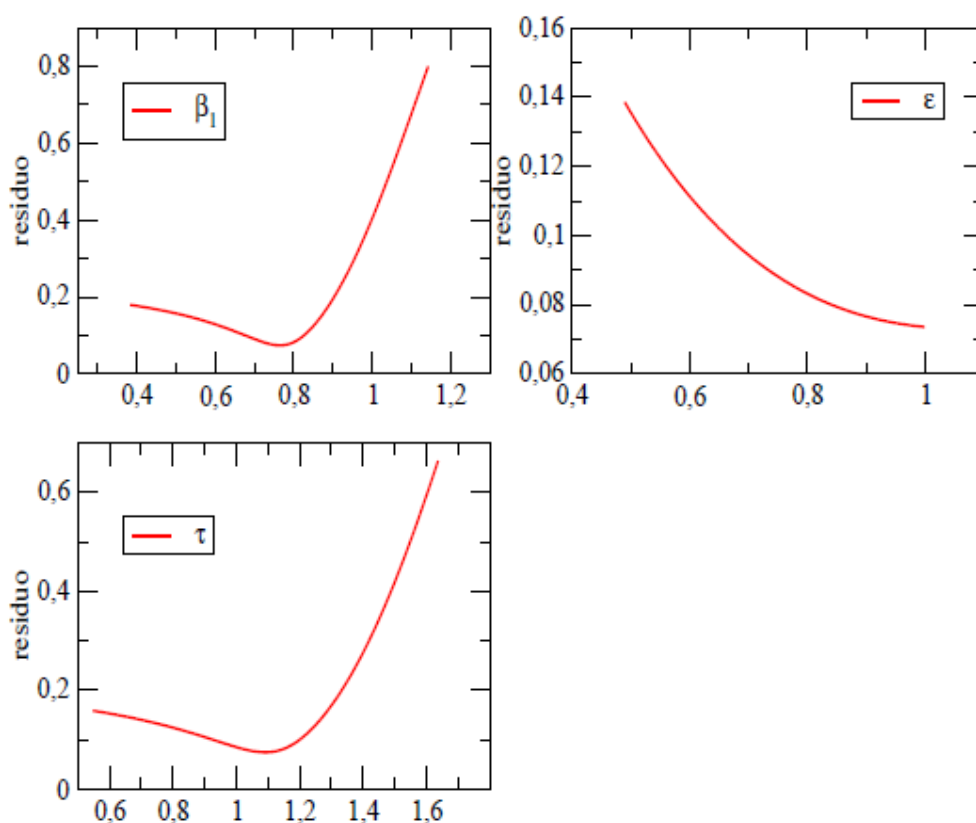


Figura 27. Dependência do resíduo com cada um dos parâmetros obtidos pelo processo de otimização do modelo matemático para a infecção subclínica por *Corynebacterium* spp. em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

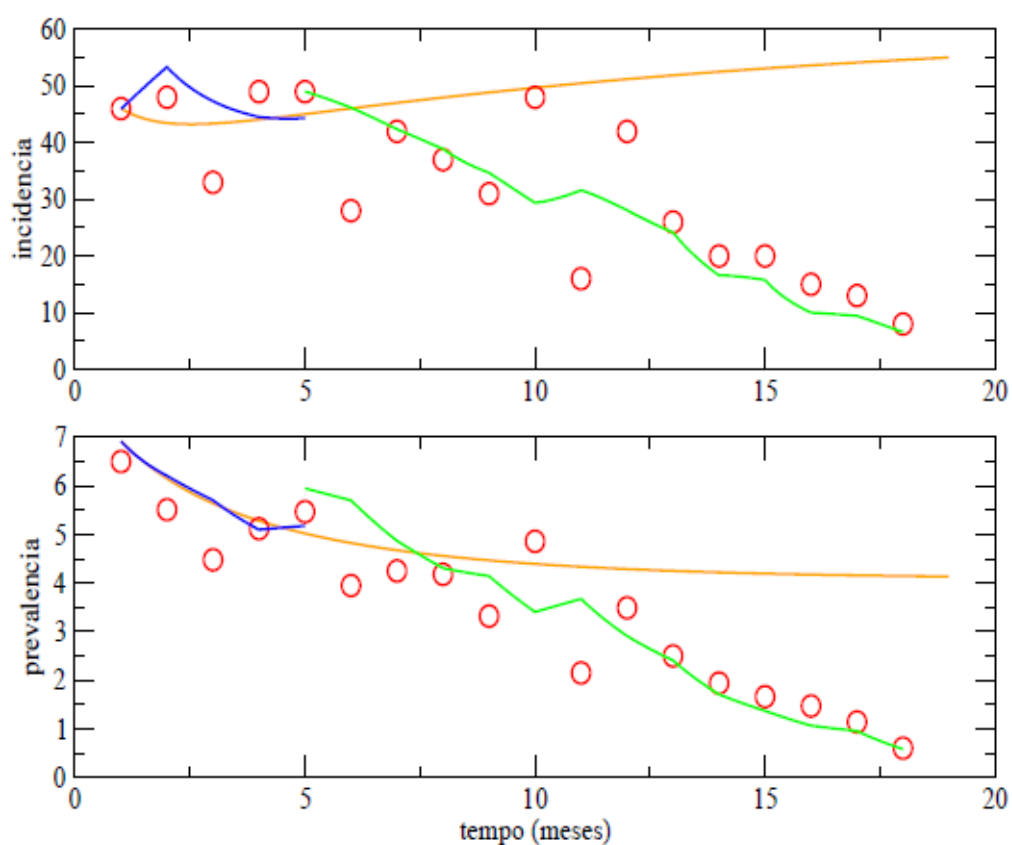


Figura 28. Incidência e prevalência da infecção subclínica causada pelo *Corynebacterium* spp. baseado nos dados coletados e na modelo matemático para doença em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

6. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que com o adequado conhecimento analítico da mastite bovina pode-se obter resultados satisfatórios no controle das mastites no Brasil. O grande entrave recaí sobre a percepção dos fazendeiros quanto ao problema, conhecimento sobre a sanidade da glândula mamária e o entendimento das medidas a serem adotadas (JANSEN et al., 2010).

No Brasil ainda não há um consenso para o desenvolvimento de um programa nacional de controle de mastite como há em outros países como a Holanda, Estados Unidos, Canadá e o Reino Unido, por exemplo. As medidas adotadas para a melhoria dependem em muito de um adequado diagnóstico *in loco* para enfim adotar meios de se obter uma adequada melhoria (LeBLANC et al., 2006; JANSEN et al., 2010; RUEGG, 2011).

No presente estudo os quatro primeiros meses foram de colheita e tabulação de dados, sem quaisquer indicativas ou retorno ao produtor. É importante frisar que qualquer intervenção poderia ter gerado fatores de confusão a cerca dos problemas que cerceavam a produção.

Neste contexto, a CCS média do tanque foi extremamente importante para avaliar a magnitude da MS. Nos quatro primeiros meses a média de CCS do tanque foi de 685.000 células somáticas/mL de leite com média de 53,4% de MS e nos últimos quatro meses do estudo a CCS média do tanque foi de 195.250 células/mL de leite e 25,90% de MS. Um estudo na Holanda demonstrou uma considerável correlação entre a média de CCS do tanque e a ocorrência de MS, sendo que tanque com média de 400.000 células somáticas/mL de leite indicou cerca de 25% de MS no rebanho (LIEVAART et al., 2007). É informalmente aceitável que a média de CCS do tanque indique de forma subestimada, mas com certa confiabilidade a magnitude de MS, onde 200.000 células somáticas/mL, 300.000 células somáticas/mL, 400.000 células somáticas/mL e 500.000 células somáticas/mL indiquem 20-25%, 30-35%, 40-45% e 50-55% de prevalência de MS no rebanho, respectivamente e que valores acima disso já não apresentariam confiabilidade (RUEGG, 2003).

Dois testes consecutivos de CCS individual de vaca foram importantes para calcular o status da MS e a partir disso usar os dados históricos em conjunto com dados reprodutivos e zootécnicos para tomar decisões sobre o futuro da vaca no rebanho. Isso

foi importante principalmente para o grupo de vacas com MS crônica, mantendo-se praticamente inalterado na fase de diagnóstico e com queda estatisticamente significativa ($p = 0,02$) ao longo dos meses. Na fase de intervenção, planilhas com vacas crônicas na MS, que não emprenhavam, com mais de 270 dias de lactação, produção inferior à 23 kg de leite/dia e com mais de duas lactações foram indicadas ao descarte. A taxa de descarte não foi calculada, pois em determinado momento esse controle foi perdido. Em programas de controle de MS esse fator foi relevante para diminuição da prevalência, pelo simples fato do reconhecimento de grupos problemas e que causam um maior risco para a doença (RUEGG, 2003; RODRIGUES et al., 2005; LUKAS et al., 2005; JANSEN, 2010).

O fato de a prevalência ter diminuído no presente estudo está intrinsicamente relacionado com o descarte de vacas crônicas na MS, manutenção adequada das ações de pré e pós-dipping, identificação de vacas com isolamento de patógenos contagiosos na MS, elucidação de grupos de risco com base no número de lactações, na fase de lactação, na produção diária de leite e na maior atenção àquelas vacas com CCS alta. A identificação de fatores de risco conforme observadas no modelo estatístico contribuíram ao longo do estudo para que isso fosse possível.

Quando vacas com MS causadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram identificadas, eram rapidamente segregadas para o final da ordenha tratadas e posteriormente retestadas. Caso ainda apresentassem o micro-organismo em questão ou eram descartadas ou sofriam ablação da glândula mamária. A intolerância aos patógenos contagiosos foi um fator importante no programa de controle como bem elucidado na literatura (RUEGG, 2011; LANGONI, 2013).

No presente estudo foi encontrada relação negativa entre a produção de leite diária/vaca e a ocorrência de MS (estimativa = - 0,036; $p < 0,0001$) concordado com os achados de RODRIGUES et al. (2005). Este fato ocorreu porque vacas que estão sadias certamente estarão produzindo mais leite que as vacas doentes (SHOOK, 1982).

Foi encontrada no presente estudo uma relação positiva entre a ocorrência de MS dado que a vaca também estivesse doente um, e ou dois, e ou três meses antes. Caso a vaca estivesse com MS no mês anterior a chance de ocorrência foi 4,06 vezes maior ($p < 0,0001$). Mesmo que intuitivamente óbvio este achado foi pouco mensurado nos estudos recentemente observados e essa relação no modelo pode mascarar ou fomentar outras variáveis.

A dificuldade em mensurar a relação entre as medidas adotadas e o controle de MS foi um fator negativo no presente estudo. Não foi possível subdividir os grupos que receberam uma determinada medida, aceitando-se o fato de que todo o rebanho sofreu as mesmas medidas de controle, sendo assim só foi possível testar no modelo os índices zootécnicos. RODRIGUES et al. (2005) trabalharam com vários rebanhos, medindo diferentes variáveis e mensurando o efeito do rebanho para os controle das mastites.

Um fato relevante no presente estudo foi a baixa relação entre a MC com a MS. Quando se fixou no modelo os efeitos da MC sobre a MS demonstrou-se um efeito negativo, estatisticamente significativo, para casos de MC no mesmo mês, e ou um e ou dois meses antes. Esse achado diverge dos encontrados por RODRIGUES et al. (2005) que observaram um efeito positivo, onde MC culminou em MS.

O fato de a MC não estar relacionada à MS no presente estudo pode estar relacionado com a não colheita de leite destes animais para CCS quando se encontravam em tratamento de MC, diminuindo, portanto a chance de mensuração deste parâmetro.

Outro fator poderia ser a forma de detecção e a manutenção de registro de MC. Também poderia estar implicado nessa relação negativa o aspecto microbiológico nas duas formas da doença. Ficou nítido que a prevalência de MS foi basicamente por patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e principalmente pela presença de *Corynebacterium* spp. Já na MC os patógenos ambientais foram os mais frequentemente isolados como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Streptococcus* spp.

A explicação pode ser reforçada pela presença de *Corynebacterium* spp. na MS. Bradley (2003) relata que *Corynebacterium* spp. causa IIM de baixa intensidade e isso pode estar relacionado ao fato de que este patógeno esteja presente na camada de queratina do teto, e devido a esta localização de adesão pode exercer proteção contra invasões por outros patógenos causadores de mastite e ainda não cause danos graves ao tecido glandular mamário, fator que poderia explicar a relação não tão clara entre a MS e MC.

O grande entrave para o sucesso de programa de controle de mastite é a diminuição da incidência da doença (BARKEMA, 1999; RODRIGUES et al., 2005; LUKAS et al., 2005; RUEGG, 2011). No presente estudo tanto para MS quanto para MC esse índice praticamente permaneceu inalterado, demonstrando que para que a

incidência diminua é necessário a adoção de outras medidas, principalmente àquelas que diminuem a pressão de infecção em vacas jovens e no início da lactação.

Na MS a identificação de fatores de risco demonstrou um perfil de ocorrência de patógenos contagiosos, visto que vacas com estágios de lactação adiantada e mais velhas estavam mais propensas a permanecerem cronicamente infectadas. Só o fato de estarem mensalmente sendo monitoradas, induziu à retirada da ordenha ou mesmo o descarte, o que explica a diminuição do status crônico de MS ao passo que as vacas sadias foram permanecendo sadias. Aliando este fato a um monitoramento mais rigoroso nos processos de pré e pós-dipping culminou em diminuição da infecção por patógenos contagiosos, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* spp.

A mudança no perfil de bactérias isoladas de MS chamou atenção, visto que ao passo que *Corynebacterium* spp. foi sendo controlado, *Staphylococcus* coagulase-negativa foi sendo mais isolado. Isso corrobora com os achados de LAM et al. (1997) que concluíram que a presença de *Corynebacterium* spp. em animais experimentalmente infectados protegem a glândula mamária contra os principais patógenos, inclusive estafilococos coagulase-negativa e *Staphylococcus aureus*.

De uma forma geral, a maioria dos casos de MC tem um curso curto ou ligeiramente moderado, são tratados pelos funcionários da fazenda, sem consultar um médico veterinário especialista. No Brasil manter registros de mastite clínica ainda é uma barreira e neste caso os índices de prevalência e incidência não são tão confiáveis. Outro fator importante varia quanto ao custo do tratamento, visto que está diretamente relacionado com a taxa de detecção da mastite clínica. No presente trabalho a média de mastite clínica ao longo do estudo foi de 11,1% (2,7%), já em uma revisão onde elencou dados de 26 anos a taxa média foi de 14,2%, porém os estudos utilizam diferentes definições de mastite clínica (KELTON et al., 1998).

A taxa de prevalência de MC durante o estudo variou pouco, não sendo estatisticamente significativo. A taxa de incidência de mastite clínica no presente estudo foi de 7,6% o que não corrobora com os dados de Peeler et al. (2000) onde a incidência foi de 36,7% em um estudo no Reino Unido.

Ocorreu uma relação positiva entre MC e o mês, porém sem significância estatística. O modelo não convergiu quando se utilizou a produção diária de leite/vaca. Muitos estudos apontam para uma maior pressão de ocorrência de MC para vacas nos

primeiros dias de lactação (WAAGE et al., 1998; ELBERS et al., 1998; BARKEMA et al., 1999; PANTOJA et al., 2009). No presente estudo vacas com até 90 dias de lactação mostrou efeito negativo (estimativa = - 0,30; $p = 0,69$), porém sem significância estatística. Vacas entre 181 – 270 dias de lactação apresentaram 1,40 ($p=0,03$) vez mais chance de desenvolverem MC, discordando do estudo realizado por WAAGE et al. (1997) que demonstrou essa ocorrência em vacas nos primeiros 30 dias de lactação.

Vacas de primeira lactação apresentaram relação negativa para ocorrência de MC ($p = 0,0003$) quando comparadas com vacas acima de duas lactações corroborando com os achados de RIEKERINK et al. (2008). O histórico de MC também apresentou relação positiva para a ocorrência de MC, vacas com caso de MC um mês antes e três meses antes tiveram 2,18 e 1,88 vezes mais chances de estarem com MC, respectivamente.

Ao analisar a influência da MS na ocorrência de MC foram observados como fator de risco vacas acima de 91 dias de lactação ($p < 0,05$), com casos de MC um mês ($p < 0,0001$) e ou três meses anteriores ($p = 0,0004$) e com MS um mês antes ($p < 0,0001$), todos estes colaborando positivamente para ocorrência de MC. Isso reforça que a MS foi importante para ocorrência de MC, neste caso pode-se suspeitar que a MS resultasse em MC, diferente do que ocorreu quando se fixou a MS e analisou o efeito da MC.

O presente estudo demonstrou não ter sido tão eficiente no controle da MC, tanto da incidência quanto da prevalência, visto que a variável mês apresentou relação positiva para ocorrência de MC, mesmo sem significância estatística, porém com uma forte tendência estatística ($p = 0,06$). As vacas apresentaram 1,27 vezes mais chances de desenvolverem MC com o passar o estudo. Esse achado pode estar atrelado a várias questões: 1. As intervenções foram feitas na fazenda, pelos funcionários, sem acompanhamento contínuo; 2. Problemas na identificação de MC na fazenda, podendo uma vaca ser diagnosticada de forma errada, porém sem efetivamente estar doente; 3. A maior ocorrência de patógenos ambientais que resultam em casos leves, porém flutuantes; e 4. Ser o grande entrave nos programas de controle de mastite por ter relação com inúmeros fatores.

A cura microbiológica da MC clínica foi de apenas 51,3% (249/485), esses achados estão distantes dos encontrados por PIZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG (2011) que encontraram 77,2% (78/101) de cura clínica. Do primeiro caso 20,5% (144/704) desenvolveram o segundo caso. Do segundo caso 20,5% (144/704) desenvolveu o

terceiro caso corroborando com os achados de Pizón-Sánchez e Ruegg (2011) que foi de 21,8% (26/119) e 20% (5/25), para o primeiro e segundo caso, respectivamente.

Dos fatores de riscos analisados para ocorrência do insucesso na terapia antimicrobiana de MC o modelo previu apenas significância estatística para a ordem do caso e o micro-organismo isolado. Os graus 1 ($p = 0,6$) e 2 ($p = 0,4$) de severidade apresentaram uma relação negativa para ocorrência de insucesso do tratamento de MC, deixando claro que severidade grau 3, que apresentou uma frequência maior de patógenos ambientais, tinham maior chance de insucesso.

A duração do tratamento ($p = 0,4$), vacas em primeira lactação ($p = 0,4$) e a classe 5 de medicamento ($p = 0,80$), formulação à base de tetraciclina, bacitracina, neomicina e prednisolona, também apresentaram uma relação negativa com a ocorrência de insucesso no tratamento da MC, porém sem significância estatística. Nada foi indicado como intervenção para o tratamento de MC, pois requeria mais tempo para uma análise mais fidedigna.

No presente estudo, descritivamente os patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp. apresentaram mastite clínica de severidade grau um. Ao passo que as bactérias de origem ambiental, mais especificamente as enterobactérias induziram mastite clínica de severidade grau três, porém sem significância estatística.

Quando se restringe aos patógenos, 83,3% das MC causadas por *Staphylococcus aureus*, seguido de *Streptococcus agalactiae* com 75% e *Pasteurella* spp. com 72,7% resultaram em insucesso ao tratamento de MC. A chance de cura quando a MC foi causada por enterobactérias foi de 66%, seguida por estafilococos coagulase-negativa que foi de 74,2%. Neste caso os patógenos secundários e os patógenos ambientais apresentam um melhor cenário para cura de MC, mesmo quando as enterobactérias implicaram em severidade grau três.

O modelo linear generalizado mostrou que os micro-organismos da classe 1 (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*), da classe 2 (*Enterobacteriaceae* e outros ambientais) e da classe 5 (cultivo microbiológico contaminado) resultaram em 11,36 (estimativa = 2,43; $p = < 0,0001$), 1,73 (estimativa = 0,55; $p = 0,03$) e 3,00 (estimativa = 1,10; $p = 0,03$) vezes mais chances de insucesso ao tratamento de MC. Quanto à classe 1 vários trabalhos corroboram os achados deste estudo (WILSON et al., 1999; GROHN et al., 2004; PIZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG, 2011). Em relação à classe 2, micro-organismos de origem ambiental isso se deve à maior ocorrência de severidade

de MC grau 3 (PIZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG, 2011), porém um achado raro no presente estudo é a ocorrência de insucesso no tratamento de MC para resultados microbiológicos contaminados, demonstrando que esse tipo de resultado não deve ser totalmente ignorado.

Culturalmente na rotina de uma fazenda produtora de leite há uma tendência a se usar o tratamento associado para melhorar a eficiência na cura de MC, porém no presente estudo, isso não foi estatisticamente significativo. Mesmo que o tratamento intramamário (tópico) tenha mostrado uma relação positiva de 1,16 mais chances de insucesso ao tratamento de MC em relação ao tratamento associado. O tratamento associado tende a ter um custo financeiro maior, não justificando no presente trabalho o uso deste tipo de tratamento.

A alta prevalência de *Corynebacterium* spp. como causador de MS no presente estudo chamou atenção desde o início do estudo. O papel e a magnitude deste micro-organismo como causador de MS é bastante questionável (BRADLEY, 2003). Ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa ($p = 0,01$) na prevalência de *Corynebacterium* spp. isolado de MS no presente estudo.

Como nenhuma medida foi direcionada para o controle específico de *Corynebacterium* spp. ao final tentou-se elucidar com base em um modelo matemático de SIR adaptado a real eficiência das medidas adotadas de forma geral. O modelo mostrou que na dinâmica da infecção, indivíduos que se curavam logo após a incidência, indivíduos cronicamente infectados que se curavam espontaneamente, a entrada de sadios e a saída de indivíduos do compartimento de novas infecções por motivo de descarte ou qualquer outro, foram os parâmetros mais importantes.

As medidas de pré e pós-dipping conjuntamente com a identificação de vacas problemas e a terapia de vacas seca contribuíram para a diminuição da ocorrência de MS causada por *Corynebacterium* spp. (LAM et al., 2007).

A maioria dos trabalhos que tratam da instituição de um plano de controle de mastite no Brasil não ressalta para a importância de um adequado diagnóstico antes de tomar as decisões para o controle. No presente trabalho, a fase de diagnóstico foi essencial para elaborar ações que fossem efetivamente importantes a curto e a médio prazo para um controle de mastite no rebanho. Identificar o perfil de patógenos que causam mastite clínica e mastite subclínica é essencial para saber quais ações serão tomadas em relação às duas formas da doença.

7. CONCLUSÕES

O monitoramento da mastite em um rebanho é essencial para um adequado controle da doença. O levantamento epidemiológico temporal foi importante para saber quais grupos de animais deveriam sofrer a maior intervenção. No presente trabalho as ações indicadas foram eficientes no controle da mastite subclínica, principalmente na identificação de indivíduos cronicamente infectados, porém tais ações não foram eficazes para diminuição da incidência, tanto de mastite clínica como de mastite subclínica.

A alta taxa de insucesso no tratamento de mastite clínica demonstra que este é um ponto importante em um programa de controle. Não houve nenhum tipo de intervenção prática na forma de tratamento dos casos identificados, mas a longo prazo, conhecendo os aspectos epidemiológicos será essencial instituir e padronizar o tratamento.

Dentro dos critérios estabelecidos nos regulamentos técnicos nacionais a propriedade está dentro dos parâmetros, mas em longo prazo outros fatores que contribuem para a prevenção da incidência devem ser melhor estudados.

De fato, o presente estudo mostrou que é possível realizar um plano de controle de mastite no Brasil, passando pelo adequado diagnóstico epidemiológico do rebanho e instituindo ações direcionadas aos problemas elencados. O monitoramento mensal da situação do rebanho foi extremamente importante na tomada de decisão individual, que somado a outras ações se mostrou eficiente na diminuição da prevalência de mastite subclínica e para o controle da mastite clínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, S.; DOHOO, I.R.; OLDE RIEKERINK, R.; STRYHN, H. Diagnosing intramammary infections: Evaluation expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p.2966-2975, 2010.
- BARLOW, J. W., WHITE, L. J., ZADOKE, R. N., SHUKKEN, Y. H. A mathematical model demonstrating indirect and overall effects of lactation therapy targeting subclinical mastitis in dairy herds. *Prevent veterinary medicine*, 90, p. 31- 32, 2009.
- BARHEMA, H. W., DELUYKER, H. A. SCHUKKEN, Y. H., LAM, T. J. G. M. Quarter-milk somatic cel count at calving and at the first six milkings after calving. *Prev. Vet. Med.* v. 38, p. 1 – 9, 1999.
- BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 81:1285-1290, 1998.
- BERRY, DP.; MEANEY, W.J Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v.75, p.81-91, 2006.
- BERTRAND, J. A. Influence of shipping container, preservative, and breed on analysis of milk components of shipped samples. *J Dairy Sci*, v. 79, n.1, p. 145 – 148, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite: Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002 e Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. – Brasília: MAPA/SE, 2012.
- BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: An Envolving Disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, p. 116 – 128, 2003.
- BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *Farm Animal Practice*, v.27, p.310-315, 2005.
- BRITTEN, A.M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.28, p.187-202, 2012.
- BUNGE, M. Epistemologia: Curso de Atualização. São Paulo: TAQ/EDUSP, 1980.
- CARVALHO, G. R. Cenário Atual e Perspectivas para a Pecuária de Leite no Brasil. Rio Verde Goiás, 16 de abril de 2011. Disponível em: <[HTTP://www.tecnoshowcomigo.com.br/palestras/7.pdf](http://www.tecnoshowcomigo.com.br/palestras/7.pdf)>. Acesso em: 08 de janeiro de 2012.

CARVALHO, M. P. Qualidade do leite: salvação da pátria ou exigência de mercado? MilkPoint, São Paulo, 4 de agosto,, 2005. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?noticialD=2530&actA=7&arealD=50&secaoID=124>>.

Acesso em: 08 de janeiro de 2012.

CARVALHO, M. P.; MARTINS, P. C.; WRIGHT, J. T. C.; SPERS, R. G. Cenários para o leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de leite. 190., 2007.

CASSOLI, L. D. Uma pergunta simples: A qualidade do leite tem melhorado nos últimos anos? Disponível em <[http:// http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/uma-pergunta-simples-a-qualidade-do-leite-tem-melhorado-nos-ultimos-anos-79994n.aspx](http://http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/uma-pergunta-simples-a-qualidade-do-leite-tem-melhorado-nos-ultimos-anos-79994n.aspx)> Acessado em 27/07/2012.

COENTRÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; BRITO E PAIVA, M . A. V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteira. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v.60, n.2, p. 283 – 288, 2008.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira no país. Ver. Educ. Continuada, São Paulo, v.1, n.1, p. 3 – 9, 1998.

COSTA, E. O. Programa nacional de melhoria na qualidade do leite (PNMQL). Rev. NAPGAMA, São Paulo, v. 8., n.2, p. 18 – 21, 2005.

COSTA, E. O.; RAIÁ, M. R.; WATANABE, E. T.; GARINO, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. Napgama, v.3, n.4, p. 14 – 17, 2000.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.1, p. 19 – 24, 2008.

DE HASS, T.; VEERKAMP, R.; BARKEMA, H.; GROHN, Y.; SCHUKEEN, Y. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell counts patterns. J. Dairy Sci. v. 87, p. 95 – 105, 2004.

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

- DRIESSCHE, P. V. e WATMOUGH, J. Reproduction numbers and sub-threshold endemic equilibria for compartmental models of disease transmission. *Math. Biosci.* 180, p. 29 – 48., 2002.
- DODD, F .H. Mastitis; progresso in control. *Journal of Dairy Science*, Chamapaign, v.66, n.8, p.1773-1780, 1983.
- DOHOO, I. R., LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intra-mammary infections. *Prev. Vet. Med.* v.10, p. 225 – 237, 1991.
- DOHOO, I. R., MEEK, A. H. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.* n.23, p. 119 – 125, 1982.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Segunda Edição. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá, 2011.
- DURÃO, M. Avaliação da Implementação de um Programa de Qualidade do Leite em uma média propriedade leiteira. Curso de Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instituto Brasileiro de Pós-Graduação Qualittas. Universidade de Castelo Branco. Brasil. P.30 – 51, 2008.
- ELBERS, A. R. W.; MILTENBURG, J. D.; LANGE, D.; CRAUWELS, A. P . P.; BARKEMA, H . W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk Factors for Clinical Mastitis in a Random Sample of Dairy Herds from the Southern Part of The Netherlands. *J. Dairy Sci.* v.81, p. 420 – 426, 1998.
- ERSKINE, R. J.; WILSON, R. C.; RIDDELL, M. G. JR. TYLER, J. W.; SPEARS, H. J.; DAVIS, B. S. Intramammary administration of gentamicin as treatment for experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *Am J Vet Res*, Chicago, v.53, n.3, p. 375 – 382, 1992.
- FAGUNDES, M. H. Leite: situação atual e perspectivas para o setor. 2003. Disponível em <HTTP:// www.conab.gov.br/conabweb/download/.../leite_inter_26_agosto.pdf> Acesso em 01 de outubro de 2012 .
- FETROW, J. Mastitis: Na economic consideration. In *Proceeding 39th Annual Conference National Mastitis Council*, Atlanta GA, Feb 13-16, pp.3-47, 2000.
- FIELD, A. Descobrindo a estatística usando SPSS. Porto Alegre, 2ª edição. Artmed. 608 páginas, 2009.
- FIGUEIREDO, J. C.; PAULILLO, L. F. Gênese, modernização e reestruturação do complexo agroindustrial lácteo. *Organizações Rurais e Agroindustriais*, Lavras, v. 7, n. 2, p. 173 – 187, 2005.

FORSBACK, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; ANDRÉN, A.; AKERSTEDT, M.; ANDRÉE, L.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.3569-77, 2010.

GUIMARÃES, F. F. Modificação na geografia da produção mundial de leite. Ver. NAPGAMA. v. 9, n.1, p. 19 – 23, 2006.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.1, p. 38 – 45, 2009.

GROHN, T. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* v.87, p.3358 – 3374, 2004.

HILLERTON, J.E.; COOPER, J.; MORELLI, J. Preventing bovine mastitis by a postmilking teat disinfectant containing acidified sodium chlorite. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.1201-1208, 2007.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 63-68, 69-72, 96-97, 181-182, 220-221, 231-233.

IDF, International Dairy Federation. Bovine Mastitis. *Animal Health Newsletters*. Issue 5. Brussels, Belgium, 2011.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary*, v.37, p.1-20, 1998.

JANSEN, J.; SCHAIK, G. V.; RENES, R. J.; LAM, T. J. G. M. The effect of a national mastitis control program on the attitudes, knowledge, and behavior of farmers in the Netherlands. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 5737 – 5747, 2010.

KERMACK, W. O. e McKENDRICK, A. G. A contribution to Mathematical Theory of Epidemics. *Journal Royal Statistic Social*, 115, 0. 1103 – 1130, 1927.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR., W. C. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1395p., 1997.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. V.1, Baltimore, The Williams and Wilkins Co, 1984.

LAGO, A.; RHODA, D.; COOK, N. B. Using DHIA recorded individual cow somatic cell counts to determine clinical mastitis treatment cure rates. In: *Proc. 43rd Ann. Conf. NMC*. Charlotte. p. 290 – 291, 2004.

- LAM, T.J.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN VLIET, J.H.; GROMMERS, F.J.; TIELEN, M.J.; BRAND, A. Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* v. 58, p. 17 – 22 , 1997.
- LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, , vol.33, no.5, p.620-626. ISSN 0100-736X , 2013.
- LANGONI, H., SILVA, A. V., CABRAL, K. G., DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Rev. Bras. Med. Vet.* V.20, n.5, p.204-209, 1998.
- LANGONI, H.; CORRÊA, C. N. M.; CORRÊA, W. M.; CARREIRA, E. L. C. Etiologia e tratamento das mastites bovinas com auxílio do dimetilsufóxido (DMSO). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. V.4, p. 1-4, 1984.
- LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no Estado de São Paulo. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.51, n.3, 1994.
- LeBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* V. 89, p. 1267 – 1279, 2006.
- LIEVAART, J. J.; BARKEMA, H. W.; KREMER, W. D. J.; VAN DEN BROEK, J.; VERHEIJDE, N. J. H. M. and HEESTERBEEK, J. A. P. Effect of herd characteristics, management practices, and season on different categories of the herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 90: 4137- 4144, 2007.
- LUKAS, J. M.; HAWKINS, D. M.; KINSEL, M. L.; RENEAU, J. K. Bulk Tank Somatic Cell Counts Analyzed by Statistical Process Control Tools to Identify and Monitor Subclinical Mastitis Incidence. *J. Dairy Sci.* v.88, p. 3944 – 3952, 2005.
- MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Characteristics of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science* 86:3466-3472, 2003.
- Mastitis control program (NMC). Madison: National Mastitis Council, 1999. Disponível em; <http://nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf>. Acessado em: 02/02/2011.
- MEIN, G. A. The role of the milking machine in mastitis control. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice – Mastitis in Dairy Cows*. Elsevier, Philadelphia – USA. v.28, n.2, p. 307-320, 2012.

MILKPOINT. MilkPoint Comenta especial com Laerte Cassoli: a IN51 e o que precisaria ser feito para adequação da nova proposta. Disponível em <<http://http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/milkpoint-comenta-especial-com-laerte-cassoli-a-in51-e-o-que-precisaria-ser-feito-para-adequacao-da-nova-proposta-77011n.aspx>> Disponível em 22/12/2011.

MULLER, E.E. Profilaxia e Controle da Mastite. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Maringá. Anais...Maringá: 2000. P.10-13.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts on bovine mastitis. 3 ed. Arlington, 1987. P.5-46.

NEIJENHUIS, F., H. W. BARKEME, H. HOGEVEEN, J.P.T.M., NOORDHUIZEN. 2000. Classification and longitudinal examination of calloused teat ends in dairy cows. J Dairy Sci. 83:2795-2804.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D.F; SCHOLL, D. T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. J Dairy Sci. 91:1366-1377, 2008.

OLI, M. K.; VENKATARAMN, M.; KLEIN, P. A.; WENDLAND, L. D.; BROWN, M. B. Population dynamics of infectious disease: a discrete time model. Ecological Modeling. 198, p. 183 – 194, 2006.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCON, J.J.; CAJERO-JUAREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATINO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. The Journal of Infection, v.54, p.399-409, 2007.

PANTOJA, J. C. F.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Somatic cell counts status across the dry period as risk factor for the development of clinical mastitis in subsequent lactations. J. Dairy Sci. v. 92, p. 113 – 155, 2011.

PHLIPOT, W.N., NICKERSON, S.C. Mastitis: Counter Attack. Naperville, IL, Babson Bros. Co, 150 p. 2002.

PIZÓN-SÁNCHEZ, C., RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. J Dairy Sci. v. 94, p. 3397 – 3410, 2011.

PYORALA, S.; KAARTINEN, L.; KACK, H.; RAINIO, V. Efficacy of two therapy regimes for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in the bovine. J Dairy Sci. v. 77, p. 453 – 461, 1994.

- POL, M.; RUEGG, P.L. Treatment practices and quantification of antimicrobial usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90:249-251, 2007.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K. & CARTER, G.R. 1994. MASTITIS, p.327-344. In: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K. & CARTER, G.R. (ed.) *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London, 1994.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10 ed. 2007.
- RIEKERINK, R. G. M. O.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D. F.; SCHOLL, D. T. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* v.91, p. 1366-1377, 2008.
- RODRIGUES, A.C.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RUEGG, P.L. Management of Wisconsin Dairy herds enrolled in Milk Quality Teams. *Journal of Dairy Science*. v. 88, p. 26660-2651, 2005.
- RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 19, p. 47 – 73, 2003.
- RUEGG, P. L. Managing mastitis and producing quality milk. In: Risco, C. a., Melendez, P., Editors. *Dairy Production Medicine*. John Wiley & Sons, Inc., NJ, 2011.
- RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28(2), 149–63. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.001, 2012.
- SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. S. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina de choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulos, v. 41, p. 320 – 326, 2004.
- SANTOS, J.E.; CERRI, R.L.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim, Repro. Sci*, 80: 31-45, 2004.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Microrganismos patogênicos transmitidos pelo leite. In: *Estratégias para o controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. Manole: São Paulo, p.268 – 277, 2007.

- SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, 2009.
- SCHALM, O. W. & NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130:199-204, 1957.
- SCHEPERS, A. J., LAM, T. J.; SCHUKKEN, Y. H., WILMINK, J. B.; HANEKAMP, W. J. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci. v.80, p. 1833 – 1840, 1997.
- SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALES, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet. Res. v. 34, p. 579 – 576, 2003.
- SHELDRAKE, R. F.; HOARE, R. J. T.; MCGREGOR, G. D. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cell counts, electrical conductivity, and serum albumin in milk. J. Dairy Sci. v. 66, p. 542 – 547, 1983.
- SHOOK, G. G. Approaches to summarizing somatic cell counts which improve intertrepatbulity. In: National Mastitis Council Annual Meeting, 21, 1982.
- Udder topics (NMC). Madison: National Mastitis Council, 2006. Disponível em: http://nmconline.org/newsletters/UT35-01_02.pdf. Acessado em 29/10/12.
- USDA. Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991-2007. USDA-APHIS-VS, CEAH Fort Collins, CO, 2008.
- VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. Anais...Maringá:UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.
- WAAGE, S.; SVILAND, S.; ODEGAARD, S. A. Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. J. Dairy Sci. v.81, p.1275-1284,1998.
- WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; CASE, K. L. ; GARRISON, L. L.; GROHN, Y. T. Comparison of Seven Antibiotic Treatments with no Treatment for Bacteriological Efficacy Against Bovine Mastitis Pathogens. J. Dairy Sci. v.82, p. 1664-1670, 1999.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo enviado para publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (ISSN 0100-736X) com ID: PVB – 4228.

Proposta de um Programa de Qualidade do Leite e Controle da Mastite em Rebanho Bovino de Vacas Holandesas¹

Guido G. Wanderley ², Luzia A. Trinca³, Benedito D. Menozi ², Marcella Z. Troncarelli ², Anelise. Salina², Helio. Langoni ^{2*}

Abstract.- Wanderley G.G., Trinca, L. A., Menozi B.D., Troncarelli M.Z., Salina A. & Langoni H. 2015. [Proposal for a Quality Milk Program and Control of Mastitis in Holsteins Cows Cattle Herd.] Proposta de um Programa de Qualidade do Leite e Controle da Mastite em Rebanho Bovino de Vacas Holandesas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n – Botucatu, São Paulo, CEP:18618-900, Brasil.

Mastitis is a disease that more burdens the world dairy sector still major obstacle to improving production. The aim of this prospective epidemiological study was to develop a mastitis control plan in a Holstein cow herd. The property has been visited for 18 months to harvest data and control plane of the institution. The first four months corresponded to the diagnostic phase, followed by an intervention phase amounting to 14 months. The control plan has reduced from 53.7% to 23.3% subclinical mastitis. The somatic cell count of the tank reduced from 1446 x 10³ cells / ml to 214 x 10³ cells/ml. The prevalence of clinical mastitis was 11.11% and the average incidence was 7.6%. Of the total 704 cases, 30.1% (217/704) could not be evaluated for bacteriological cure because there is no post-treatment samples, 51.3% (249/485) healed, 49.7% (236/485) failed and repeated the same pathogen or failed to isolation of a new pathogen. Of the total 485 cases that could be evaluated for bacteriological cure 71.9% (349/485), 19% (92/485), 7.4% (36/485) and 1.6% (8/485) They were, respectively, related to the first, second, third and fourth cases of clinical mastitis in the same mammary gland. There was treatment failure in 53.65% (44/82), 47.5% (165/347) and 48.21% 27/56, severity one, two and three, respectively. The mastitis control plan was effective in reducing the prevalence of subclinical mastitis and elucidate the clinical mastitis rates through simple measures of management and grounded in proper epidemiological diagnosis.

INDEX TERMS: bovine mastitis, milk quality, epidemiology, risk factors.

¹Recebido em

Aceito em

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n – Botucatu, São Paulo, CEP:18618-900, Brasil. *Autor para correspondência: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni).

³Departamento de Estatística, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulisa – UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n – Botucatu, São Paulo, 18618-900, Brasil.

RESUMO.- A mastite é a afecção que mais onera o setor leiteiro mundial, sendo ainda importante entrave para melhoria da produção. O objetivo deste estudo epidemiológico prospectivo foi desenvolver um plano de controle de mastite em um rebanho de vacas Holandesas. A propriedade foi visitada durante 18 meses para colheita de dados e instituição do plano de controle. Os primeiros quatro meses corresponderam à fase de diagnóstico, seguida de uma fase de intervenção perfazendo 14 meses. O plano de controle reduziu de 53,7% para 23,3% a mastite subclínica. A contagem de células somáticas do tanque reduziu de 1446×10^3 células/mL para 214×10^3 células/mL. A prevalência de mastite clínica foi 11,11% e a incidência média foi de 7,6%. Do total de 704 casos, 30,1% (217/704) não puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica, por não haver a amostras pós-tratamento, 51,3% (249/485) curaram, 49,7% (236/485) falharam e repetiram o mesmo patógeno ou falharam com isolamento de um novo patógeno. Do total de 485 casos que puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica 71,9% (349/485), 19% (92/485), 7,4% (36/485) e 1,6% (8/485) eram, respectivamente, referentes aos primeiros, segundos, terceiros e quartos casos de mastite clínica na mesma glândula mamária. Houve falha no tratamento em 53,65% (44/82), 47,5% (165/347) e 48,21% 27/56, severidade um, dois e três, respectivamente. O plano de controle de mastite foi eficiente em reduzir a prevalência de mastite subclínica e elucidar os índices de mastite clínica, através de medidas simples de manejo e embasada no adequado diagnóstico epidemiológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mastite bovina, qualidade do leite, epidemiologia, fatores de risco.

INTRODUÇÃO

O Brasil vem apresentando um constante crescimento na produção de leite. Só em 2008, a produção nacional apresentou um crescimento de 5,5%, quando comparada com 2007. Com um rebanho leiteiro de aproximadamente 21,5 milhões de animais, é o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, constituindo índices de produtividade e qualidade ainda desfavoráveis. Em média uma vaca brasileira produz por dia pouco mais de quatro litros de leite, cerca de sete vezes menor que nos Estados Unidos que têm o quarto maior rebanho leiteiro do mundo e é o maior produtor, ou apenas o equivalente a 20% do que uma vaca francesa produz (Fagundes, 2012).

A melhoria no cenário do índice de produtividade dos rebanhos brasileiros deve estar alicerçada na adoção de tecnologias que melhorem a eficiência e o uso dos fatores de produção. O aprimoramento das raças, bem como das técnicas de manejo relacionadas à alimentação e à sanidade do rebanho exercem papel fundamental no aumento da produtividade do leite. A crescente preocupação dos consumidores em relação à qualidade dos produtos em geral tem levado a indústria alimentícia a buscar adequações que atendam às exigências do mercado. A demanda por qualidade do leite ocorre em razão de dois fatores importantes: um no que diz respeito ao cumprimento legal de padrões mínimos regidos pela Instrução Normativa N° 62 (IN62) (Brasil, 2012) e o segundo refere-se às exigências de qualidade por parte da empresa compradora e da percepção pelo consumidor (Figueiredo & Paulillo, 2005).

No Brasil, mesmo com o estabelecimento de um marco legal em 2002, a Instrução Normativa N° 51 (IN51) (Brasil, 2012), a qualidade do leite não alcançou os padrões previstos para 2011 que seriam 750 mil UFC/mL de leite (unidade formadora de colônia/mililitro de leite) para contagem bacteriana total (CBT) e 750 mil células/mL de leite para contagem de células somáticas do leite (CCS). Dados da Clínica do Leite/ESALQ-Piracicaba, São Paulo, mostram que 20% e 15% dos produtores não estariam nos padrões para CBT e CCS, respectivamente. Com a revogação da IN51 em dezembro de 2011, a nova legislação a IN62, que estabelece novos limites válidos para 2016, 50% dos produtores estariam fora dos padrões para ambos os requisitos: 400 mil CCS/mL e 100 mil UFC/mL (Milkpoint, 2011).

A revogação da IN51 e a publicação da IN62 com novos prazos para 2016 demonstra a fragilidade da produção de leite de vaca no Brasil, explicado principalmente pela não adequação de índices de CBT e CCS, principalmente, por mais da metade dos produtores até 2011. Outro ponto é que a IN51 não previa punição para os produtores de leite que não atendessem aos requisitos de qualidade, já na IN62, o produtor será notificado e o produto deverá sofrer destinação indicada pelo estabelecimento, baseado nas Normas de Destinação do Leite e Derivados, incluindo o produtor como peça fundamental para a melhoria na qualidade do leite (Brasil, 2012).

Para alguns autores, a melhoria da qualidade do leite depende essencialmente da política de aquisição da matéria-prima por parte da indústria (Carvalho, 2005). Dados recentes publicados pela Clínica do Leite (ESALQ, Piracicaba) com produtores que participam de um programa de valorização por qualidade e outros que não participam, mostram uma melhora significativa na CBT no grupo que participa do programa em relação ao que não participa, sendo 65% e 23%, respectivamente. Quando se analisa a CCS, 55% dos que não recebem por qualidade e 49% dos que recebem por qualidade estariam fora dos padrões da IN62, o que pouco evoluiu em cinco anos de análise, demonstrando que o pagamento por qualidade não é o único fator para a melhoria nos índices de qualidade (Cassoli, 2012).

Existem poucos estudos epidemiológicos prospectivos em rebanhos bovinos leiteiros brasileiros, principalmente usando estes dados para implementar programas de controle de mastite bovina. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi implementar um programa de controle de mastite bovina em um rebanho de vacas Holandesas a partir de uma fase de diagnóstico a fim de propor medidas que fossem adotadas continuamente ao longo de 18 meses de análises.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O programa de controle de qualidade do leite foi implementado após uma fase de investigação (diagnóstico) e posterior intervenção (plano de controle de mastite) como ilustrado na Figura 1.

2.2 Unidade produtiva de leite

A fazenda utilizada no estudo localiza-se na região geográfica Centro do Estado de São Paulo, município de São Pedro. Possui clima tropical de altitude, 580m acima do nível do mar, bioma de cerrado e temperatura média de 22° C. Possui um típico rebanho leiteiro de vacas Holandesas, sendo ordenhadas mecanicamente por sistema carrossel, com capacidade para 17 vacas. Possui em média 330 vacas em lactação/mês ordenhada três vezes por dia com perspectivas de crescimento de 8-15% anualmente, produz em média 11 mil kilogramas de leite/dia, destinado pelo menos a dois laticínios situados na região. Foi assinado um termo de responsabilidade entre o produtor, que esteve disposto a seguir as recomendações e o orientador, a fim de estabelecer o compromisso com o presente estudo.

2.3 Plano do estudo

Durante o período de abril de 2012 a outubro de 2013 foram realizadas as seguintes etapas do projeto:

1) Diagnóstico e definição do problema: levantamento epidemiológico do status de mastite no rebanho. O período para diagnóstico e definição do problema compreendeu, portanto os meses de abril, maio, junho, julho e agosto de 2012.

2) Análise preliminar dos dados e levantamento de hipóteses: esta fase ocorreu imediatamente após a fase de diagnóstico. O levantamento realizado nos primeiros cinco meses do estudo foram compilados a fim de gerar hipóteses para a formulação das ações de controle dos meses subsequentes. Exatamente no quinto mês do estudo (agosto/2012) o relatório da fase de diagnóstico foi confeccionado e discutido para as possíveis intervenções realizadas;

3) Fase de intervenção – plano de controle de mastite: com os dados elencados na fase de diagnóstico, após adequada interpretação foram formuladas ações para tentativa do plano de ação para o controle de mastite no rebanho estudado. Esta fase iniciou-se em agosto de 2012 e foi até outubro de 2013.

2.4 Coleta de amostras de leite

Monitoramento da mastite subclínica (MS)

Foram realizadas visitas mensais durante todo o período do estudo, coletando-se leite para o monitoramento da MS de todo o rebanho. Como teste de triagem para amostras do leite dos quartos mamários foi o *California Mastitis Test* (CMT) (Schalm & Noorlander, 1957), qualitativo para a presença de células somáticas e amostras de leite com escores positivo (+, ++ ou +++).

Foram coletadas tanto para CCS, quanto para cultivo microbiano. Independente do CMT positivo ou negativo, foi coletada amostra de leite composta de cada vaca para CCS. Quando pelo menos um quarto mamário foi positivo ao CMT, foi coletado 15 mL de leite para cultivo microbiano em tubos estéreis e 50 mL de leite do respectivo quarto mamário para CCS individual em frasco plástico contendo conservante celular bronopol (Bertrand, 1996). Foi também coletada amostra de leite do tanque de expansão para CCS. A CCS foi realizada em equipamento Somacount 300® (Bentley, UK) por citometria de fluxo, no Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS – FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo.

A MS foi considerada quando a CCS foi maior que 200 mil células/mL de leite. Os seguintes índices epidemiológicos foram calculados com base em testes de CCS consecutivos: 1) casos novos: vacas que apresentassem um teste anterior menor que 200 mil células/mL de leite e o consecutivo maior; 2) casos crônicos: considerados quando houvesse dois testes consecutivos maiores que 200 mil células/mL de leite; 3) vacas curadas: quando um teste anterior com mais de 200 mil células/mL e o consecutivo menor e 4) vacas sadias: quando dois testes consecutivos apresentassem menos que 200 mil células/mL de leite. Esses índices foram mensurados mensalmente.

Mensalmente os dados foram tabulados em planilhas, a fim de elaborar um documento que contemplasse todo o histórico da vaca, para acesso destes dados na rotina diária da fazenda.

Monitoramento da mastite clínica – registro de mastite clínica (MC)

Paralelamente foi instituído um registro de casos de MC. Protocolo de avaliação de cada caso clínico diagnosticado era anotado em planilha específica disposta na fazenda, preenchidas logo que a mastite era diagnosticada contendo os seguintes itens: vaca, teto, início do caso clínico, severidade da mastite (severidade 1: quando alterações no leite; severidade 2: quando alterações visíveis no leite e no úbere; severidade 3: quando alterações visíveis no leite, no úbere e a vaca apresentou-se apática), medicamento utilizado, via de aplicação do medicamento, total de dias de descarte do leite, término do tratamento, total de dias que o leite demorou em retornar

ao normal e se houve perda do teto. Paralelamente no momento do diagnóstico uma amostra de leite do quarto foi coletada, antes do tratamento, e congelada para cultivo microbiano. Vinte e um dias após o tratamento da MC, uma segunda amostra do mesmo caso clínico foi coletada e congelada para cultivo microbiano. Foram considerados como caso novo de mastite clínica, aqueles ocorridos após 14 dias ao caso anterior, e quando o micro-organismo fosse diferente na segunda amostra de leite (Ruegg, 2003; Pizón & Ruegg, 2011).

Cultivo microbiano

O cultivo microbiano foi realizado de acordo com os procedimentos do *National Mastitis Council* (NMC, 1999). Inicialmente foram cultivados 10 microlitros de cada amostra, em meios de ágar sangue ovino a 8% e ágar MacConkey incubando-se a 37° C aerobicamente, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, durante 3 dias. A morfologia das colônias era avaliada, com relação ao tamanho, forma, odor, pigmento e hemólise. As colônias isoladas em ambos os meios de cultivos foram repicadas em caldo cérebro-coração (BHI), estudadas quanto às características fenotípicas e morfológicas pela coloração de Gram e classificadas bioquimicamente, de acordo com Hirsh e Zee (2003).

Foram consideradas como amostras positivas as que revelaram o isolamento de três ou mais colônias de um mesmo micro-organismo, exceto para *Staphylococcus aureus* que foi considerado a partir do isolamento de uma colônia. No caso de isolamento de três ou mais micro-organismos a amostra foi considerada como contaminada.

2.5 Elaboração do programa de controle da qualidade do leite: intervenção

Durante os cinco primeiros meses, foi realizado um diagnóstico, um estudo observacional do rebanho, sem quaisquer intervenções. Munidos destas informações, os dados foram avaliados estatisticamente e elaborado um plano de ação contendo primeiramente os principais pontos a serem atingidos para melhoria da qualidade de produção de leite. O diagnóstico dos primeiros cinco meses resultou em uma lista de problemas ou fatores de risco que tiveram sua avaliação contínua, levando-se em consideração o custo-benefício das possíveis intervenções indicadas para a melhoria.

Foi elaborado um plano de ações que durou 15 meses, contemplando uma lista de ações focando-se nas intervenções que têm maiores impactos no problema de qualidade do leite. Esta lista gerada com os dados dos cinco primeiros meses tiveram intervenções de comum acordo, com informações claras e diretas no que tange à eliminação dos problemas.

2.6 Ações indicadas na fase de intervenção

Tratamento de mastite clínica

Padronizou-se de acordo com a severidade sendo que para severidade grau um, seria realizado três dias de tratamento e severidade graus dois e três indicou-se seis dias de tratamento. Neste ponto, em dezembro de 2012 (cinco meses decorrido da fase de intervenção) foi abolida este tipo de prática e foi indicado para todos os casos de mastite clínica, cinco dias de tratamento, independente da severidade do caso. O tratamento deveria ser discutido com os responsáveis pela fazenda baseando-se na história da vaca, disponibilizado em um planilha de resultados mensais.

Tratamento de mastite subclínica

As vacas com isolamento de *Streptococcus agalactiae*, tão logo fossem identificadas passaram por *blitzterapia*, que consistiu no tratamento da glândula afetada com penicilina por três dias.

Vacas de alta produção e de importância genética, mesmo com isolamento crônico de *Staphylococcus aureus* não foram encaminhadas para descarte, porém indicou-se a secagem forçada e definitiva da glândula afetada com 10 mL de iodopovidona à 10% após a ordenha total. Aquelas com isolamento deste patógeno, porém em dois ou mais quartos, foi indicado o descarte ao final da lactação, sendo, entretanto, remanejadas para o último lote, para ordenha final.

Descarte de animais

Na fase de intervenção foi elaborada uma lista de descarte mensal, baseada na planilha de resultados e respeitando-se alguns critérios: vacas com isolamento de *Staphylococcus aureus* e de *Streptococcus agalactiae* que não curassem após à *blitzterapia*; repetidoras de MC; vacas cronicamente infectadas de forma subclínica por *Pasteurella* spp.; vacas com CCS crônica com idade avançada, baixa fertilidade e baixa produção de leite.

Pré e pós-dipping

No pré-*dipping* foi usado iodo a 0,5% até dezembro de 2012 e a partir deste mês iniciou-se com o cloro a 0,5%. No pós-*dipping* indicou-se a mudança do ácido láctico para o iodo a 1%.

Linha de ordenha

Readequação e formação de linha de ordenha que até a fase de diagnóstico era feita de forma inadequada, onde as vacas recém-paridas permaneciam no mesmo ambiente que o lote cinco, ou seja, lote de vacas problema. Foi indicada a mudança de *stall* e entrada destes animais no primeiro lote, antes de todos os outros. O segundo lote foi formado por vacas de primeira lactação sem histórico de mastite clínica e subclínica, o terceiro lote era formado por vacas de segunda lactação ou mais, de alta produção, o quarto lote era formado por vacas que se recuperavam de episódios de mastite e o quinto lote foi designado como lote problema, onde as vacas deveriam ser tratadas e terem o leite descartado.

2.7 Análise estatística

Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar a população e estimar índices produtivos e epidemiológicos de importância de acordo com Dohoo (2010).

Análise univariada foi realizada para identificar possíveis fatores de risco para a ocorrência de mastite no rebanho. Testes de Qui-quadrado e Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foram usados para testar a associação entre a presença de mastite clínica ou subclínica e vários fatores de manejo, ambientais e de produção (Dohoo, 2010).

Modelos de regressão logística (PROC GLIMMIXQ, SAS Institute, 2009) foram usados para identificar fatores de risco para mastite em análise multivariada. A razão das chances (*odds ratio*) foi a medida de associação de escolha (Dohoo, 2010).

Para avaliar a eficácia do programa, modelos lineares mistos e regressão logística foram usados para comparar os índices epidemiológicos e produtivos entre as fases de diagnóstico e intervenção, corrigindo para fatores de confusão como estação do ano. O nível de significância estatística foi definido em 0.05 (Dohoo, 2010).

Para avaliação do tamanho do efeito tanto para mastite subclínica quanto para mastite clínica foi usado o modelo linear generalizado misto para variável binária a ser analisada com função de ligação logito (Field, 2009).

Neste modelo entraram como preditoras para mastite subclínica e mastite clínica as seguintes classes: número de lactação (1 = uma lactação, 2 = duas lactações e 3 = três ou mais lactações); dias em lactação (1 = 1 – 90, 2 = 91 – 180, 3 = 181 – 270 e 4 = > 270 dias em lactação); mês (foi usado apenas o efeito linear para esta classe); produção diária média e o estado subclínico da vaca um mês (prev1), dois (prev2) e três meses (prev3) antes de cada análise. O efeito de vaca foi considerado aleatório (Field, 2009).

Para avaliação do sucesso do tratamento da mastite clínica foi utilizado o Teste de Qui-quadrado e Fischer quando necessário para testar a associação entre o insucesso do tratamento com as variáveis mensuradas. Para tanto foram testadas as associações entre o insucesso na terapia de casos de mastite clínica com a ordem do caso; se primeiro, segundo, terceiro ou quarto caso na mesma glândula; a variável mês; a severidade do caso, se grau 1, 2 ou 3; duração do tratamento; dias em lactação (1 = 1 – 90, 2 = 91 – 180, 3 = 181 – 270 e 4 = > 270 dias em lactação); número de lactação 1 = uma lactação, 2 = duas lactações e 3 = três ou mais lactações); tipo de tratamento, se tópico ou associado; princípio ativo do antimicrobiano e micro-organismo isolado do caso clínico.

2. RESULTADOS

Características do rebanho

Foram avaliadas todas as vacas ordenhadas ao longo dos 19 meses de estudo, totalizando 699 vacas (338 ± 35), com média de 2,2 lactações/vaca e de 32,65 litros de leite/vaca.

Mastite subclínica

A média de CCS do tanque de expansão foi de 316 000 CCS/mL de leite. E a variação temporal está ilustrada na Figura 2.

A média de mastite subclínica em todo o período do estudo foi de 39,3%. Os primeiros quatro meses, que corresponderam à fase de diagnóstico demonstraram que pelo menos metade das vacas apresentaram mastite subclínica (Figura 3.).

Na Figura 4 está ilustrado o *status* de mastite subclínica. Houve uma importante redução na taxa de vacas crônicas após implementação das medidas de controle, principalmente pela identificação individual e indicação de descarte. A taxa de novos casos se manteve constante, sempre ao redor ou acima de 10%. Conseguiu-se uma redução do tempo da doença por algum fator, seja ele o descarte ou até mesmo a cura espontânea.

Para analisar a interação entre as variáveis estudadas e a mastite subclínica, foi usado no modelo linear generalizado misto, conforme observado na Tabela 1.

No parâmetro histórico de mastite subclínica, a análise se baseia apenas no momento anteriormente discriminado, ou seja, quando se assume três meses, significa dizer que leva apenas em consideração o histórico pontual no terceiro mês anterior ao caso, ignorando um mês e dois meses antes. Se uma vaca apresenta mastite subclínica no mês atual o modelo prevê apenas se há três meses ela também estava com mastite subclínica e assim sucessivamente.

Ao longo do estudo o mês demonstrou uma relação negativa para a ocorrência de mastite subclínica (estimativa = - 0,32; $p < 0,001$), ou seja, com o passar dos meses a ocorrência de mastite subclínica foi diminuindo com as vacas apresentando apenas 30% de chances de continuarem apresentando a doença (razão de chances = 0,70).

A produção diária de leite por vaca também apresentou uma relação negativa para a ocorrência de mastite subclínica (estimativa = - 0,04; $p < 0,001$), porém com

razão de chances próxima a um, o que enfraquece tal achado. Intuitivamente este achado demonstra que uma vaca que possui produção diária maior que a média do estudo tem menos chance de estar com mastite subclínica.

A chance uma vaca apresentar mastite subclínica foi de 4,06 ($p < 0,001$) vezes, 2,36 ($p < 0,001$) vezes e 1,59 ($p < 0,001$) vez maior se estivesse doente há um, dois e três meses, respectivamente.

O número de lactações apresentou efeito negativo para a ocorrência de mastite subclínica em vacas de primeira e segunda lactação, sendo que as primíparas apresentaram apenas 36% ($p < 0,001$) de chance de ocorrência e as vacas com duas lactações tiveram chance de ocorrência 78% ($p=0,04$).

A variável dias em lactação também apresentou efeito negativo para ocorrência de mastite subclínica. Vacas com até 90 dias de lactação tinham 10% ($p=0,0006$) de chance, vacas entre 91 – 180 dias de lactação apresentaram 55% ($p < 0,001$) de chance e vacas entre 181 – 270 dias de lactação apresentaram 61% ($p < 0,001$) em relação àquelas com mais de 270 dias de lactação.

Mastite clínica

Durante o estudo a prevalência e a incidência de mastite clínica se mantiveram constantes, indicando o desafio para o controle (Figura 5).

Do total de 704 casos de MC, 70,9% (499/704) foram primários (incidência), 20,5% (144/704) do segundo caso no mesmo teto na mesma lactação, 7,2% (51/704) correspondente ao terceiro caso no mesmo teto na mesma lactação e 1,4% (10/704) referente ao quarto caso do mesmo teto na mesma lactação.

Do total de 704 casos, 68,9% (485/704) puderam ser avaliados quanto à cura bacteriológica, por ter sido coletada a segunda amostra, 51,3% (249/485) apresentaram sucesso na terapia (curaram), 49,7% (236/485) demonstraram o insucesso na terapia de MC e repetiram o mesmo patógeno.

Do total de 485 casos avaliados, 71,9% (349/485), 19% (92/485), 7,4% (36/485) e 1,6% (8/485) eram, respectivamente, referentes ao primeiro, segundo, terceiro e quarto casos de mastite clínica no mesmo teto.

De acordo com a ordem de cada caso de mastite clínica as taxas de insucesso do tratamento de MC foram de 44,1% (154/349), 55,4% (51/92), 69,5% (25/36) e 85,7% (6/8), respectivamente para o primeiro, segundo, terceiro e quarto caso no mesmo teto e na mesma lactação.

Do total de 236 casos de insucesso ao tratamento antimicrobiano de mastite clínica 65,25% (154/236) eram referentes ao primeiro caso, 21,61% (51/236) ao segundo caso de mastite clínica, 10,6% (25/236) ao terceiro caso de mastite clínica e 2,6% (6/236) ao quarto caso de mastite clínica.

Do total de 485 casos 16,9% (82/485), 71,5% (347/485) e 11,5% (56/485) eram referentes aos graus de severidade um, dois e três, respectivamente. Destes, ocorreram insucesso ao tratamento antimicrobiano de MC em 53,65% (44/82), 47,5% (165/347) e 48,21% 27/56 ao grau de severidade um, dois e três, respectivamente.

A interação entre as variáveis mensuradas e a mastite clínica está ilustrada na Tabela 2. O fator mês, diferentemente do que ocorreu com a MS, não apresentou significância estatística.

O número de lactações apresentou relação negativa com a ocorrência de MC, sendo nas vacas de primeira lactação estatisticamente significativo em relação às vacas de segunda ou mais lactações (estimativa = - 0,57; $p = 0,0003$).

Em relação aos dias em lactação, vacas entre 91 – 180 dias em lactação apresentaram um efeito positivo estatisticamente significativo para a ocorrência de MC (estimativa = 0,34; $p = 0,03$), apresentando 1,40 vez mais chance que as vacas acima de 270 dias.

Ocorreu efeito positivo entre a ocorrência de MC no momento atual dado que também havia ocorrido um mês antes (estimativa = 0,78; $p < 0,001$), apresentando 2,18 vezes mais chances para que isso ocorresse. Quando se observa a o momento atual dado que ocorreu MC há três meses, a chance de ocorrência é de 1,88 vezes maior (estimativa = 0,64; $p = 0,002$).

3. DISCUSSÃO

No presente estudo, os quatro primeiros meses foram empregados para colheita e levantamento de dados, sem quaisquer indicativas ou retorno ao produtor. É importante frisar que qualquer intervenção poderia ter gerado fatores de confusão a cerca dos problemas que cerceavam a produção, pois munido disso certamente teriam ocorrido intervenções indevidas.

Neste contexto, a CCS média do tanque foi extremamente importante para avaliar a magnitude da MS. Nos quatro primeiros meses a média de CCS do tanque foi de 685.000 células somáticas/mL de leite com média de 53,4% de vacas com MS e nos últimos quatro meses do estudo a CCS média do tanque foi de 195.250 células/mL de leite e 25,90% de MS. Um estudo na Holanda demonstrou uma considerável correlação entre a média de CCS do tanque e a ocorrência de MS, sendo que tanque com média de 400.000 células somáticas/mL de leite indicou cerca de 25% de MS no rebanho (Lievaart et al., 2007). É aceitável que a média de CCS do tanque indique de forma subestimada, mas com certa confiabilidade a magnitude de MS, onde 200.000 células somáticas/mL, 300.000 células somáticas/mL, 400.000 células somáticas/mL e 500.000 células somáticas/mL indiquem 20-25%, 30-35%, 40-45% e 50-55% de prevalência de MS no rebanho, respectivamente e que valores acima disso já não apresentariam confiabilidade (Ruegg, 2003).

Dois testes consecutivos de CCS individual de vaca foram importantes para calcular o *status* da MS e a partir disso usar os dados históricos em conjunto com dados reprodutivos e zootécnicos para tomar decisões sobre o futuro da vaca no rebanho. Isso foi importante principalmente para o grupo de vacas com MS crônica, mantendo-se praticamente inalterado na fase de diagnóstico e com queda estatisticamente significativa ($p = 0,02$) ao longo dos meses. Na fase de intervenção, planilhas com vacas com mastite subclínica crônicas, que não emprenhavam, com mais de 270 dias de lactação, produção inferior à 23 kg de leite/dia e com mais de duas lactações foram indicadas ao descarte. Em programas de controle de MS esse fator foi relevante para diminuição da prevalência, pelo simples fato do reconhecimento de grupos problemas e que causam um maior risco para a doença (Ruegg, 2003; Rodrigues et al., 2005; Lukas et al., 2005; Jansen, 2010).

O fato de a prevalência ter diminuído no presente estudo está intrinsicamente relacionado com o descarte de vacas crônicas na MS, manutenção adequada das ações de pré e pós-*dipping*, identificação de vacas com isolamento de patógenos contagiosos na MS, elucidação de grupos de risco com base no número de lactações, na fase de lactação, na produção diária de leite e na maior atenção àquelas vacas com CCS alta. A identificação de fatores de risco conforme observadas no modelo estatístico contribuíram ao longo do estudo para que isso fosse possível.

Quando vacas com MS causadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram identificadas, foram imediatamente segregadas para o final da ordenha, tratadas e posteriormente retestadas. Caso ainda apresentassem o micro-organismos em questão ou foram descartadas ou submetidas a ablação da glândula mamária. A intolerância aos patógenos contagiosos foi um fator importante no programa de controle como bem elucidado na literatura (Ruegg, 2011; Langoni, 2013).

No presente estudo, foi encontrada relação negativa entre a produção de leite diária/vaca e a ocorrência de MS (estimativa = - 0,036; $p < 0,0001$) concordado com os achados de Rodrigues et al. (2005). Este fato ocorreu porque vacas que estão sadias certamente estarão produzindo mais leite que as vacas doentes (Shook, 1982) e como

a mensuração foi pontual não foi possível analisar esta variação, certamente se fossem analisadas as médias de produções mensais por vaca este achado seria diferente.

Foi encontrada no presente estudo uma relação positiva entre a ocorrência de MS dado que a vaca também estivesse doente um, e ou dois, e ou três meses antes. Caso a vaca estivesse com MS no mês anterior a chance de ocorrência foi 4,06 vezes maior ($p < 0,0001$). Mesmo que relativamente óbvio este achado foi pouco mensurado nos estudos recentemente observados e essa relação no modelo pode mascarar ou fomentar outras variáveis.

A dificuldade em mensurar a relação entre as medidas adotadas e o controle de MS foi um fator negativo no presente estudo. Não foi possível subdividir os grupos que receberam uma determinada medida, aceitando-se o fato de que todo o rebanho sofreu as mesmas medidas de controle, sendo assim só foi possível testar no modelo os índices zootécnicos.

O grande entrave para o sucesso de programa de controle de mastite é a diminuição da incidência da doença (Barkema, 1999; Rodrigues et al., 2005; Lukas et al., 2005; Ruegg, 2011). No presente estudo tanto para MS quanto para MC esse índice praticamente permaneceu inalterado, indicando que para que a incidência diminua é necessário a adoção de outras medidas, principalmente àquelas que diminuam a pressão de infecção em vacas jovens e no início da lactação.

Na MS a identificação de fatores de risco demonstrou um perfil de ocorrência de patógenos contagiosos, visto que vacas com estágios de lactação adiantada e mais velhas estavam mais propensas a permanecerem cronicamente infectadas. Só o fato de estarem mensalmente sendo monitoradas, induziu à retirada da ordenha ou mesmo o descarte, o que explica a diminuição do status crônico de MS ao passo que as vacas sadias foram permanecendo sadias. Aliando este fato a um monitoramento mais rigoroso nos processos de pré e pós-*dipping* culminou em diminuição da infecção por patógenos contagiosos, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* spp.

De uma forma geral, a maioria dos casos de MC tem um curso curto ou ligeiramente moderado, são tratados pelos funcionários da fazenda, sem consultar um médico veterinário especialista. Manter registros de mastite clínica ainda é uma barreira e neste caso os índices de prevalência e incidência não são tão confiáveis. Outro fator importante varia quanto ao custo do tratamento, visto que está diretamente relacionado com a taxa de detecção da mastite clínica. No presente trabalho a média de mastite clínica ao longo do estudo foi de 11,1%, já em uma revisão onde elencou dados de 26 anos a taxa média foi de 14,2%, porém os estudos utilizam diferentes definições de mastite clínica (Kelton et al., 1998).

A prevalência de MC durante o estudo variou pouco, não sendo estatisticamente significativa. A taxa de incidência de mastite clínica no presente estudo foi de 7,6% o que não corrobora com os dados de Peeler et al. (2000) onde a incidência foi de 36,7% em um estudo no Reino Unido.

Estudos apontam para uma maior pressão de ocorrência de MC para vacas nos primeiros dias de lactação (Waage et al., 1998; Elbers et al., 1998; Barkema et al., 1999; Pantoja et al., 2011). No presente estudo vacas com até 90 dias de lactação apresentou efeito negativo (estimativa = - 0,30; $p = 0,69$), porém sem significância estatística.

Vacas de primeira lactação apresentaram relação negativa para ocorrência de MC ($p = 0,0003$) quando comparadas com vacas acima de duas lactações corroborando com os resultados de Riekerink et al. (2008). O histórico de MC também apresentou relação positiva para a ocorrência de MC, vacas com caso de MC um mês antes e três meses antes tiveram 2,18 e 1,88 vezes mais chances de estarem com MC, respectivamente.

As intervenções realizadas no presente estudo não foram suficientes para o controle da MC, tanto da incidência quanto da prevalência, visto que a variável mês

não apresentou significância estatística, porém com uma forte tendência estatística para um efeito positivo ($p = 0,06$). As vacas apresentaram 1,27 vezes mais chances de desenvolverem MC com o passar o estudo. Esse achado pode estar atrelado a várias questões: 1. As intervenções foram feitas na fazenda, pelos funcionários, sem a presença integral dos pesquisadores; 2. Problemas na identificação de MC na fazenda, podendo uma vaca ser diagnosticada de forma errada, porém sem efetivamente estar doente; 3. A maior ocorrência de patógenos ambientais que resultam em casos transitórios, sem serem percebidos.

A cura microbiológica da MC clínica foi de apenas 51,3% (249/485), esses achados não corroboram com os encontrados por Pizón-Sánchez e Ruegg (2011) que foi de 77,2% (78/101) de cura clínica. Do primeiro caso 20,5% (144/704) desenvolveram o segundo caso. Do segundo caso 20,5% (144/704) desenvolveram o terceiro caso corroborando com os achados de Pizón-Sánchez e Ruegg (2011) que foi de 21,8% (26/119) e 20% (5/25), para o primeiro e segundo caso, respectivamente.

Dos fatores de riscos analisados para ocorrência do insucesso na terapia antimicrobiana de MC o modelo previu apenas significância estatística para a ordem do caso e o micro-organismo isolado. Os graus 1 ($p = 0,6$) e 2 ($p = 0,4$) de severidade apresentaram uma relação negativa para ocorrência de insucesso do tratamento de MC, deixando claro que severidade grau 3, que apresentou uma frequência maior de patógenos ambientais, tinham maior chance de insucesso do tratamento intramamário de casos de MC.

Culturalmente na rotina de uma fazenda produtora de leite há uma tendência a se usar o tratamento associado para melhorar a eficiência na cura de MC, porém no presente estudo, isso não foi estatisticamente significativo. Mesmo que o tratamento intramamário (tópico) tenha mostrado uma relação positiva de 1,16 mais chances de insucesso ao tratamento de MC em relação ao tratamento associado. O tratamento associado tende a ter um custo maior, não justificando no presente trabalho o uso deste tipo de tratamento.

4. CONCLUSÕES

A maioria dos trabalhos que tratam da instituição de um plano de controle de mastite no Brasil não ressalta para a importância de um adequado diagnóstico antes de tomar as decisões para o controle. No presente trabalho, a fase de diagnóstico foi essencial para elaborar ações que fossem efetivamente importantes a curto e a médio prazo para um controle de mastite no rebanho. Identificar o perfil de patógenos que causam mastite clínica e mastite subclínica é essencial para saber quais ações serão tomadas em relação às duas formas da doença.

O monitoramento da mastite em um rebanho é essencial para um adequado controle da doença. O levantamento epidemiológico temporal foi importante para saber quais grupos de animais deveriam sofrer a maior intervenção. No presente trabalho as ações indicadas foram eficientes no controle da mastite subclínica, principalmente na identificação de indivíduos cronicamente infectados, porém tais ações não foram eficazes para diminuição da incidência, tanto de mastite clínica como de mastite subclínica.

A alta taxa de insucesso no tratamento de mastite clínica demonstra que este é um ponto importante em um programa de controle. Não houve nenhum tipo de intervenção prática na forma de tratamento dos casos identificados, mas em longo prazo, conhecendo os aspectos epidemiológicos será essencial instituir um maior controle neste aspecto.

De fato, o presente estudo mostrou que é possível realizar um plano de controle de mastite no Brasil, passando pelo adequado diagnóstico epidemiológico do rebanho e instituindo ações direcionadas aos problemas elencados. O monitoramento mensal da situação do rebanho foi extremamente importante na tomada de decisão individual,

que somado a outras ações se mostrou eficiente na diminuição da prevalência de mastite subclínica e para o controle da mastite clínica.

Agradecimentos.- O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP na modalidade de bolsa de mestrado 2012/24973-5.

REFERÊNCIAS

- Barkema, H. W., Deluyker, H. A. Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M. 1999. Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. *Prev. Vet. Med.* v. 38, p. 1 – 9.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Leite: Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002 e Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. – Brasília: MAPA/SE.
- Carvalho, M. P. 2005. Qualidade do leite: salvação da pátria ou exigência de mercado? MilkPoint, São Paulo, 4 de agosto,, 2005. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?noticialID=2530&actA=7&arealID=50&secaoID=124>>.
- Cassoli, L. D. 2012. Uma pergunta simples: A qualidade do leite tem melhorado nos últimos anos? Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/uma-pergunta-simples-a-qualidade-do-leite-tem-melhorado-nos-ultimos-anos-79994n.aspx>>.
- Dohoo, I. Martin, W. Stryhn, H. 2010. *Veterinary Epidemiologic Research*. Segunda Edição. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá..
- Elbers, A. R. W. Miltenburg, J. D. Lange, D. Crauwels, A. P. P. Barkema, H. W. Schukken, Y. H. 1998. Risk Factors for Clinical Mastitis in a Random Sample of Dairy Herds from the Southern Part of The Netherlands. *J. Dairy Sci.* v.81, p. 420 – 426.
- Fagundes, M. H. 2012. Leite: situação atual e perspectivas para o setor. 2003. Disponível em <[HTTP://www.conab.gov.br/conabweb/download/.../leite_inter_26_agosto.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/.../leite_inter_26_agosto.pdf)>.
- Field, A. 2009. *Descobrimos a estatística usando SPSS*. Porto Alegre, 2ª edição. Artmed. 608 páginas.
- Figueiredo, J.C. Paulillo, I. F. 2005. Gênese, modernização e reestruturação do complexo agroindustrial lácteo. *Organizações Rurais e Agroindustriais*, Lavras, v. 7, n. 2, p. 173 – 187.
- Hirsh, D. C. & Zee, Y. C. 2003. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 63-68, 69-72, 96-97, 181-182, 220-221, 231-233.
- Jansen, J. Schaik, G. V. Renes, R. J. Lam, T. J. G. M. 2010. The effect of a national mastitis control program on the attitudes, knowledge, and behavior of farmers in the Netherlands. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 5737 – 5747.
- Kelton, D. F., K. D. Lissemore, and R. E. Martin. 1998. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2502-2509.

- Langoni, H. 2013. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, , vol.33, no.5, p.620-626. ISSN 0100-736X.
- Lievaart, J. J. Barkema, H., W. Kremer, W. D. J. Van Den Broek, J. Verheijde, N. J. H. M. and Heesterbeek, J. A. P. 2007. Effect of herd characteristics, management practices, and season on different categories of the herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 90: 4137- 414..
- Lukas, J. M. Hawkins, D. M. KINSEL, M. L. Reneau, J. K. 2005. Bulk Tank Somatic Cell Counts Analyzed by Statistical Process Control Tools to Identify and Monitor Subclinical Mastitis Incidence. *J. Dairy Sci.* v.88, p. 3944 – 3952.
- Mastitis control program (NMC). 1999. Madison: National Mastitis Council, 1999. Disponível em <http://nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf>.
- Milkpoint. 2011. MilkPoint Comenta especial com Laerte Cassoli: a IN51 e o que precisaria ser feito para adequação da nova proposta. Disponível em <<http://http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/milkpoint-comenta-especial-com-laerte-cassoli-a-in51-e-o-que-precisaria-ser-feito-para-adequacao-da-nova-proposta-77011n.aspx>>.
- Pantoja, J. C. F. Hulland, C. Ruegg, P. L. 2011. Somatic cell counts status across the dry period as risk factor for the development of clinical mastitis in subsequent lactations. *J. Dairy Sci.* v. 92, p. 113 – 155.
- Peeler E.J., Green M.J., Fitzpatrick J.L., Morgan K.L., Green L.E. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *J Dairy Sci.* 2000 Nov83(11):2464-72.
- Pizón-Sánchez, C., Ruegg, P. L. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* v. 94, p. 3397 – 3410.
- Riekerink, R. G. M . O. Barkema, H. W. Kelton, D. F. Scholl, D. T. 2008. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* v.91, p. 1366-1377.
- Rodrigues, A.C.O. Caraviello, D.Z. Ruegg, P.L. 2005. Management of Wisconsin Dairy herds enrolled in Milk Quality Teams. *Journal of Dairy Science.* v. 88, p. 26660-2651.
- Ruegg, P. L. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 19, p. 47 – 73.
- Ruegg, P. L. 2011. Managing mastitis and producing quality milk. In: Risco, C. a., Melendez, P., Editors. *Dairy Production Medicine*. John Wiley & Sons, Inc., NJ.
- Schalm, O. W. & Noorlander, D. D. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130:199-204.
- Shook, G. G. 1982. Approaches to summarizing somatic cell counts which improve intertrepatbulity. In: National Mastitis Council Annual Meeting, 21.
- Waage, S. Sviland, S. Odegaard, S. A. 1998. Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* v.81, p.1275-1284.
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2. Sas Incorporation, Cary, NC, 7886 pp.

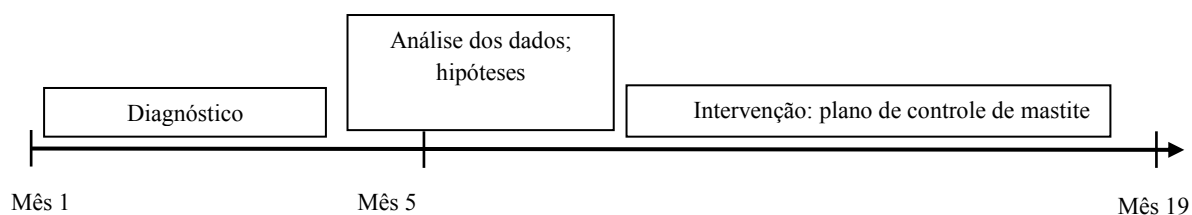


Figura 29. Plano de trabalho em três fases para a efetiva realização do programa de controle de mastite em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo 2015.

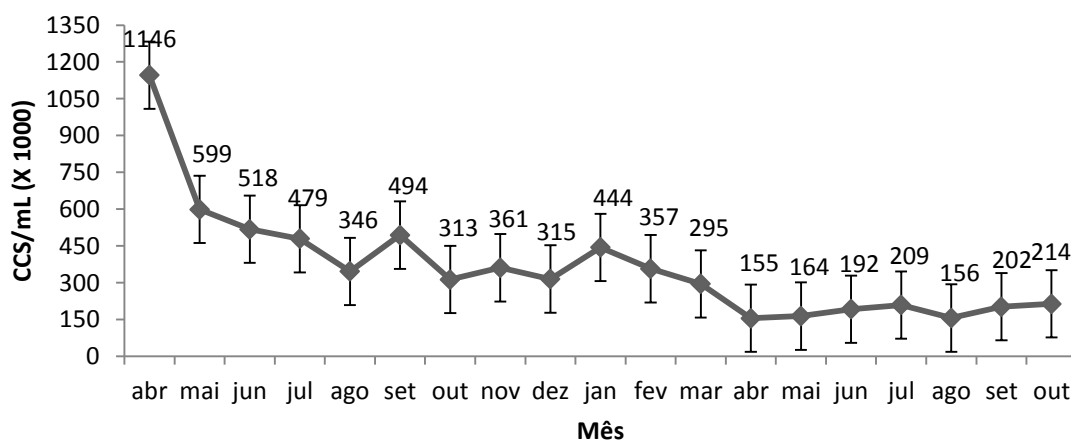


Figura 2. Contagem de células somáticas do tanque de expansão de leite de vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

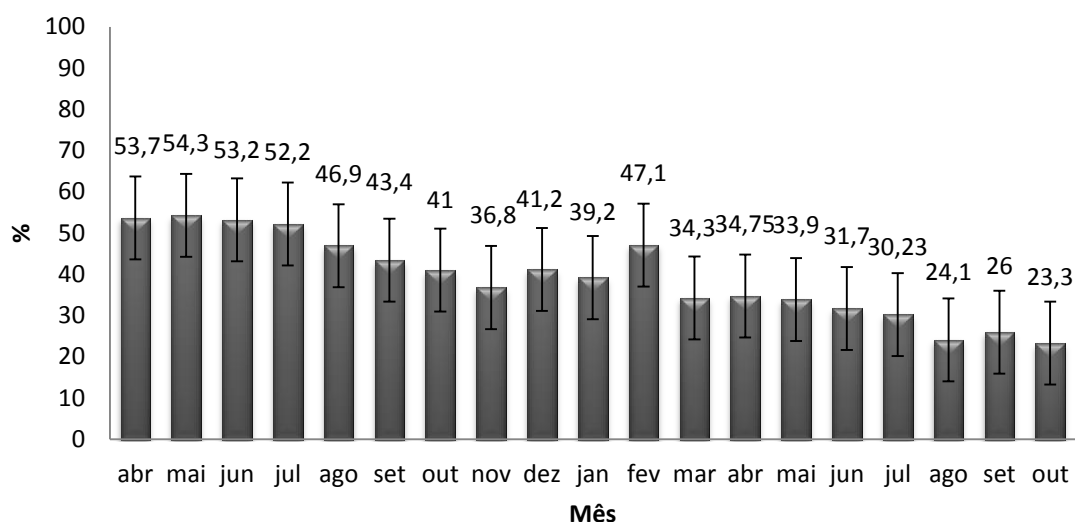


Figura 3. Prevalência de mastite subclínica no rebanho de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

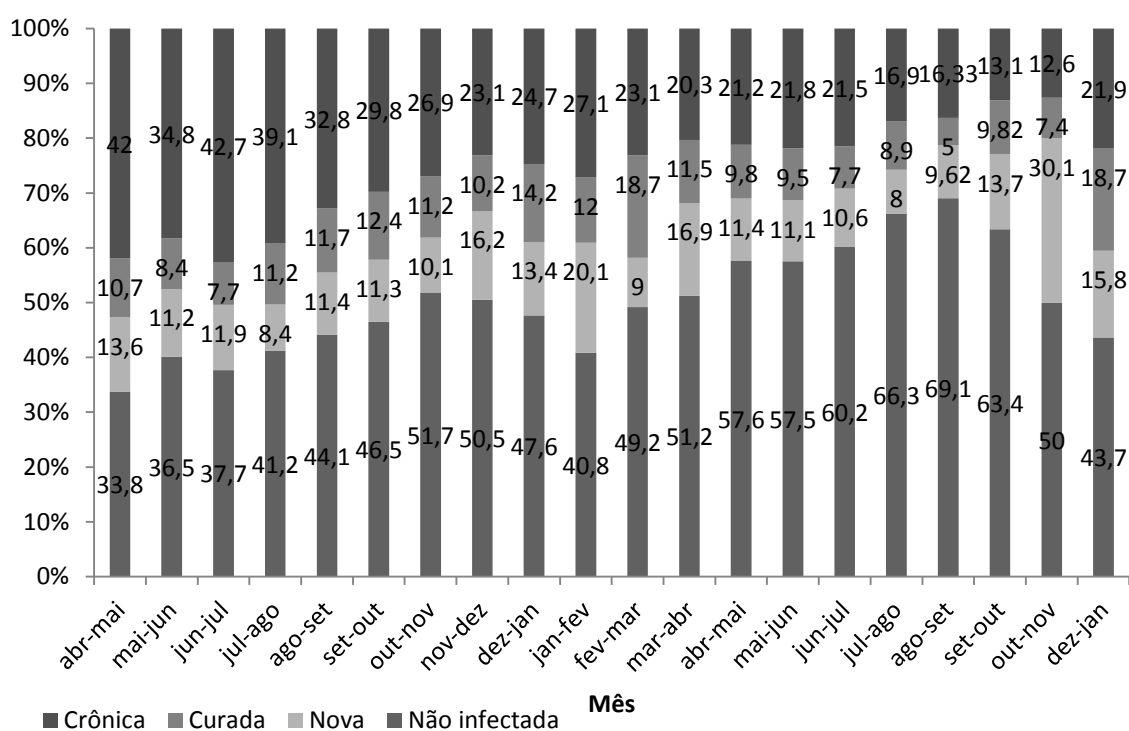


Figura 4. Status de infecção da mastite subclínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite. Botucatu, São Paulo, 2015.

Tabela 1. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite subclínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	0,69	0,20	0,007	-	-
Mês	- 0,35	0,09	< 0,001*	0,70	- 0,59 – (- 0,84)
P. diária**	- 0,04	0,005	< 0,001*	0,97	- 0,95 – (- 0,97)
Histórico de MS**					
1 mês antes	1,40	0,01	< 0,001*	4,06	3,36 – 4,91
2 meses	0,86	0,10	< 0,001*		1,93 – 2,88
antes				2,36	
3 meses	0,46	0,10	< 0,001*		1,30 – 1,93
antes				1,59	
N. lactação**					
1 lactação	- 1,03	0,11	< 0,001*	0,36	- 0,28 – (- 0,45)
2 lactações	- 0,24	0,12	0,04*	0,78	- 0,62 – (- 0,99)
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 2,30	0,67	0,0006*	0,10	- 0,02 – (- 0,38)
91 – 180	- 0,59	0,12	< 0,001*		- 0,44 – (- 0,70)
				0,55	
181 – 270	- 0,49	0,11	< 0,001*		- 0,49 – (- 0,76)
				0,61	
>270	-	-	-	-	-

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MS = mastite subclínica, N. lactação = número de lactação e DIM = dias em lactação.

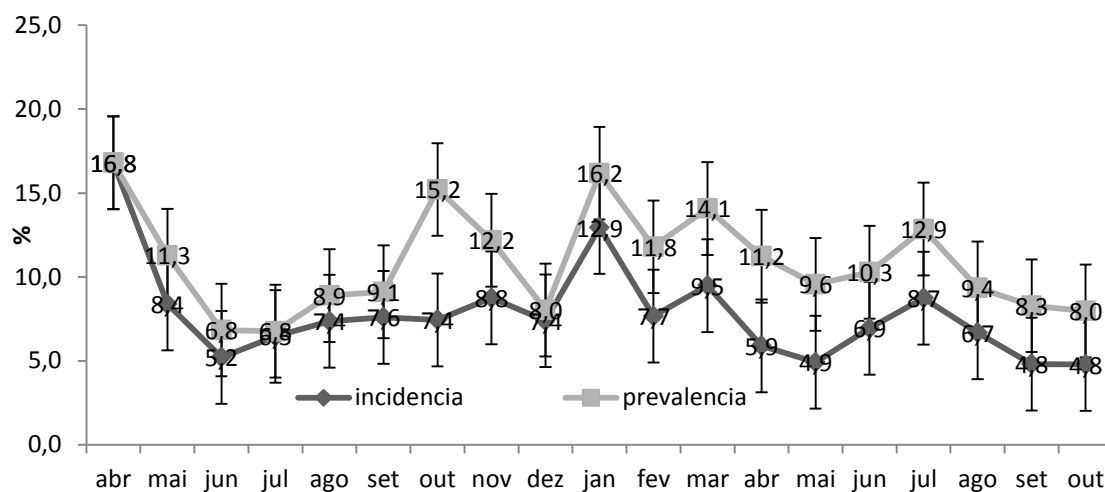


Figura 5. Incidência e prevalência de mastite clínica de vacas Holandesas submetidas ao controle de mastite durante o período do estudo. Botucatu, São Paulo, 2015.

Tabela 2. Coeficientes estimados para os parâmetros do modelo misto para mastite clínica em vacas Holandesas. Botucatu, São Paulo, 2015.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor p	RC**	IC**
Intercepto	- 2,64	0,16	< 0,001*	-	- 2,98 – (- 2,31)
Mês	0,16	0,12	0,18	1,18	- 0,08 – 0,41
P. diária**	-	-	-	-	-
N. lactação**					
1 lactação	- 0,57	0,16	0,0003*	0,56	- 0,90 – (- 0,26)
2 lactações	- 0,10	0,16	0,54	0,91	- 0,41 – 0,22
>2 lactações	-	-	-	-	-
DIM**					
1 – 90	- 0,30	0,76	0,69	0,74	- 1,80 – 1,20
91 – 180	0,34	0,16	0,03*		0,02 – 0,66
				1,40	
181– 270	0,22	0,17	0,19		- 0,11 – 0,55
				1,24	
>270	-	-	-	-	-
Histórico de MC**					
1 mês antes	0,78	0,17	< 0,001*	2,18	0,44 – 1,11
2 meses antes	0,05	0,20	0,80	1,05	- 0,34 – 0,44
3 meses antes	0,64	0,17	0,0002*	1,88	0,30 – 0,97

*Estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$).

**RC = razão das chances, IC = intervalo de confiança, P. diária = produção diária de leite, MC = mastite clínica, N. lactação = número de lactação e DIM = dias em lactação.

Normas para publicação

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for

Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"**; a referência do trabalho que serviu de fonte, **será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em **itálico (grifo)**, **e sempre em conformidade com o padrão**

adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Comprovante de Submissão

(1516 não lidos) - guidowanderley - Yahoo Mail

<https://br-mg6.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=c5m3cit4qojl4>

Início Mail Notícias Esportes Finanças Mulher Celebridades Screen Respostas Flickr Mais ▾

Buscar Buscar no Mail Buscar na Web  Início  Guido

 Escrever     Apagar  Mover ▾  Spam ▾ ...  Mais ▾ X

Entrada (1516)

- Rascunhos
- Enviadas
- Spam (5)**
- Lixeira (8)**
- Visualizações inteligentes
 - Não lido
 - Favorito
 - Pessoas
 - Social
 - Viagem
 - Compras
 - Finanças
- Pastas (184)**
 - Dell estatística
 - Guido (5)**
 - IMA (1)**
 - Junk (1)**
 - MAPA (1)**
 - Mestrado
 - milkpoint (100)**
 - NMC (1)**
 - papersnews (38)**
 - posvet (37)**
- > Recente

Pesquisa Veterinária Brasileira - Manuscript ID ... ★

emilson.queiroz@embrapa.br Hoje em 11:34 AM ★
 Para hlangani@fmvz.unesp.br
 CC guidowanderley@yahoo.com.br,
 guidowanderley@live.com, ltrinca@ibb.unesp.br,
 benedito.menozzi@fmvz.unesp.br,
 matroncarelli@yahoo.com.br, e 2 mais...

25-Jun-2015

Dear Langoni:

Your manuscript entitled "Proposta de um programa de qualidade do leite e controle da mastite em rebanho bovino de vacas Holandesas" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Your manuscript ID is PVB-4228.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Pesquisa Veterinária Brasileira. >

Sincerely,
 Pesquisa Veterinária Brasileira Editorial Office

Responder, Responder a todos ou Encaminhar | Mais

 O melhor do Yahoo Mail no seu celular

Tenha o melhor do Yahoo Mail! Baixe o app

**Proposta de um programa de qualidade do leite e controle
da mastite em rebanho bovino de vacas Holandesas**

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID:	PVB-4228
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Jun-2015
Complete List of Authors:	wanderley, guido; Instituto Mineiro de Agropecuária, Defesa Animal; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ- Universidade Estadual Paulista -UNESP-Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Trinca, Luzia; Instituto de Biociência - IBB-UNESP-Botucatu, Departamento de Estatística Menozzi, Benedito; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ- Universidade Estadual Paulista -UNESP-Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Troncarelli, Marcella; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ- Universidade Estadual Paulista -UNESP-Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Salina, Anelise; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ- Universidade Estadual Paulista -UNESP-Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Langoni, Helio; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ- Universidade Estadual Paulista -UNESP-Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Keyword:	bovine mastitis, milk quality, epidemiology, risk factors