

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados

EDUARDO FERREIRA DE OLIVIERA

**ANÁLISE ESPACIAL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E
PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE EM REBANHOS
LEITEIROS EM MINAS GERAIS, BRASIL.**

JUIZ DE FORA

2013

EDUARDO FERREIRA DE OLIVIERA

**ANÁLISE ESPACIAL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E
PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CONTAGIOSOS DA MASTITE EM REBANHOS
LEITEIROS EM MINAS GERAIS, BRASIL.**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

JUIZ DE FORA
2013

A minha família e amigos, em especial aos meus pais Roberto (em memória) e Maria Tereza e à minha esposa Luciana. Para minha filha Rafaela, que este momento seja um estímulo à sua vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por iluminar meus caminhos e me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Roberto (em memória) e Maria Tereza por todo ensinamento, amor e carinho.

À minha esposa Luciana e minha filha Rafaela que, de certa forma, abriram mão do meu convívio nestes anos.

Aos meus colegas do IMA, por toda a colaboração e apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do mestrado, em especial Gilvânia Carvalho, Lia Taveira, Marcelo dos Santos, Maynomi de Carvalho, Mônica Cardoso, Vanísia Dias, Eliane Resende e Victor Moreno, por todo o apoio e amizade.

Ao meu orientador Guilherme Nunes de Souza, pela orientação e ensinamentos que tornaram este momento possível.

Ao meu co-orientador Márcio Roberto Silva, pelos bons conselhos e incentivos dados à mim.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A mastite continua a ser um grande desafio para cadeia do leite e causa grandes prejuízos como a perda de produção, o descarte precoce de animais, os custos de tratamento e interferência na qualidade do leite. Os patógenos contagiosos são causadores de grande parte deste problema, com isso, os índices de mastite subclínica aumentam, levando conseqüentemente, ao aumento da contagem de células somáticas (CCS). Os principais patógenos contagiosos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. A CCS é utilizada em todo mundo como um indicador para avaliar e monitorar a saúde da glândula mamária e auxilia em programas de controle e prevenção de mastite. O conhecimento gerado a partir de estudos epidemiológicos específicos, sobre o padrão de infecção, prevalência de patógenos contagiosos da mastite em rebanhos bovinos leiteiros, distribuição temporal e espacial de agentes contagiosos da mastite e análise econômica de medidas sanitárias em nível de rebanho e região podem ser utilizados no aprimoramento dos programas de controle e prevenção da mastite. A epidemiologia espacial auxilia o entendimento da distribuição geográfica de dados ocorridos no tempo e espaço, e permite analisar de maneira abrangente a dinâmica de uma doença, indicando formas de atuações frente ao problema em nível de região. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre análise espacial da contagem de células somáticas e prevalência de patógenos contagiosos da mastite entre os rebanhos bovinos leiteiros. Em uma população de 112 rebanhos, foram coletadas amostras para isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* e para realização de CCS. A dependência espacial para CCS foi avaliada por meio de semivariogramas e, quando identificada dependência espacial, por meio do método de Krigagem foi criado o mapa de isolinhas para a CCS. Rebanhos com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* tiveram 9,3 vezes mais chances de apresentar valores superiores a 400.000 células/mL. Foi observada alta prevalência (89,0 a 100,0%) e distribuição homogênea entre as regiões para o *S. aureus*, no entanto não foi observada distribuição homogênea para *S. agalactiae*, cuja prevalência variou de média a alta (16 a 93%) entre as regiões estudadas. Foi observada dependência espacial

moderada (GD=37,6; $r^2=0,31$) para a CCS entre os rebanhos. Foi observada associação entre a prevalência de *S. agalactiae* e a CCS de acordo com as regiões avaliadas em função dos resultados da análise espacial. Rebanhos na área de CCS têm até 5,5 vezes mais chances de terem *S. agalactiae* isolado nas amostras de leite de tanque. A análise espacial da CCS de rebanhos pode ser uma ferramenta para auxiliar os envolvidos na tomada de decisão em nível de região no que se refere a adoção de medidas de controle e prevenção da mastite.

Palavras Chave: Epidemiologia, Krigagem, Glândula Mamária

ABSTRACT

Mastitis continues to be a major challenge for the milk chain and cause great losses as loss of production, the early disposal of animals, treatment costs and interference in the quality of the milk. The contagious pathogens are causing much of the problem, with this, the contents of subclinical mastitis increases, therefore leading to increased somatic cell count (SCC). The main contagious pathogens are *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. The SCC is used throughout the world as an indicator to evaluate and monitor the health of the mammary glands and assists control programs and prevention of mastitis. The knowledge generated from specific epidemiological studies, on the pattern of infection, prevalence of contagious pathogens of mastitis in dairy cattle herds, temporal and spatial distribution of contagious mastitis agents and economic analysis of sanitary and herd-level region can be used in the improvement of control and prevention of mastitis. Spatial epidemiology helps the understanding of the geographical distribution of data occurring in time and space, and allows comprehensively examine the dynamics of disease, indicating forms of the actuations problem region level. The objective of this study was to evaluate the relationship between spatial analysis of somatic cell counts and prevalence of contagious mastitis pathogens between dairy cattle herds. In a population of 112 herds, samples were collected for isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae* and for SCC. Spatial dependence for SCC was evaluated by means of semivariograms and, when identified spatial dependency, using the Kriging method was created the map of isolines for SCC. Herds with isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae* had 9.3 times more chances to present values above 400,000 cells/mL. High prevalence was observed (89.0 to 100.0%) and homogeneous distribution among the regions for *S. aureus*, however homogeneous distribution was not observed for *S. agalactiae*, whose prevalence ranged from medium to high (16 to 93%) among the regions studied. Moderate spatial dependence (GD = 37.6; $r^2 = 0.31$) was observed for SCC between herds. Association between the prevalence of *S. agalactiae* and SCC was observed in accordance with regions evaluated in accordance with the results of spatial analysis.

Herds in the area of SCC have up to 5.5 times more likely to have isolated *S. agalactiae* of tank milk samples. The spatial analysis of the SCC of herds can be a tool to assist those involved in decision-making at the level of the region as regards the adoption of control measures and prevention of mastitis.

Key words: Epidemiology, Kriging, Mammary Gland

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Mastite: impacto econômico e definições	13
2.2 Contagem de Células Somáticas	15
2.3 Patógenos causadores da mastite	17
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.3.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
2.3.3 Outros patógenos da mastite	19
2.4 Enfoques epidemiológicos voltados para saúde da glândula mamária	20
2.4.1 Estudos de prevalência	21
a. Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
b. Prevalência de <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
c. Relação entre patógenos da mastite e contagem de células somáticas	23
2.4.2 Importância do <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> para a pecuária leiteira	25
2.4.3 Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico microbiológico para isolamento de patógenos da mastite	27
2.5 Análise espacial de indicadores de saúde da glândula mamária	29
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 População alvo e área do estudo	33
4.2 Obtenção das coordenadas geográficas	33
4.3 Estratificação da área de estudo e plano amostral	34
4.4 Amostragem para estudo de prevalência de <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i>	34

4.5	Obtenção de amostras de leite do rebanho para exames microbiológicos	35
4.6	Obtenção de amostras de leite dos tanques dos rebanhos para contagem de células somáticas	36
4.7	Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i>	36
4.8	Cálculo da prevalência aparente e prevalência real entre rebanhos para <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i> e intervalos de confiança	37
4.9	Análise estatística.....	38
4.10	Análise geoestatística.....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	Estratificação da área de estudo	41
5.2	Características dos rebanhos de acordo com a contagem de células somáticas 42	
5.3	Relação entre CCS dos rebanhos e isolamento de <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i> do leite do tanque.....	44
5.4	Análise espacial da contagem de células somáticas de rebanho.....	47
5.5	Relação entre prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> e contagem de células somáticas de acordo com as áreas de localização dos rebanhos.....	50
5.5.1	Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	50
5.5.2	Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> com base na análise espacial da contagem de células somáticas de rebanhos	54
6.	CONCLUSÕES	58
7.	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo e ocupa atualmente o terceiro lugar entre os países produtores de leite, com 32 bilhões de litros; contudo, a produção média de 1.374 litros/vaca/ano mostra a necessidade de entender melhor os motivos para esta baixa produtividade. Dentro deste panorama, o Estado de Minas Gerais responde por 27,3% do leite total produzido no país, algo em torno de 8,7 bilhões de litros de leite. Estes dados são relativos à produção de leite que está sujeita a inspeção sanitária, não contabilizando a produção de subsistência e o leite distribuído de forma irregular (BRASIL, 2012; SIQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

A cadeia produtiva do leite se apresenta de forma heterogênea, desde a obtenção da matéria-prima até seu beneficiamento, devido as grandes diferenças encontradas dentro do território nacional. Genética, nutrição, reprodução, controle sanitário, capacitação de mão de obra e infraestrutura são alguns pontos chaves que afetam a competitividade deste segmento.

Tratando-se de controle sanitário, várias doenças endêmicas podem ser observadas em nossos rebanhos leiteiros, mas a mastite é tida como a de maior impacto na cadeia pelas suas características de acometimento, agentes patogênicos envolvidos, forma de disseminação e alterações causadas ao produto leite, causando grandes prejuízos pela perda de produção animal e de rendimento na produção de derivados lácteos.

A importância na saúde pública também é relevante, visto que casos de intoxicações alimentares estão relacionados ao consumo de leite e derivados em que os microrganismos envolvidos nos processos infecciosos da glândula mamária frequentemente estão associados a etiologia de doenças em seres humanos.

De etiologia conhecida, a mastite ou inflamação da glândula mamária, é causada na maioria dos casos por bactérias, fungos e leveduras, onde as bactérias são a causa mais comum. Pela sua etiologia e principais formas de transmissão podemos classificar os casos de mastite em contagiosa e ambiental. A apresentação da doença pode ser diferenciada em clínica e subclínica, sendo que essa última,

pela apresentação assintomática, causa grandes prejuízos (MAGALHÃES, 2006). Causada principalmente pelos patógenos contagiosos, a mastite subclínica pode responder por até 21% na redução da produção, além de acarretar a perda da qualidade do leite (HARMON, 1994; ZAFALON, 2005; MAGALHÃES, 2006).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite do tanque de expansão é um indicador da saúde da glândula mamária e serve de instrumento para tomada de decisões na abordagem da mastite em nível de rebanho. A variação da CCS de vacas em lactação, e conseqüentemente de rebanho, ocorre por vários motivos, mas sua principal fonte de variação é devido a presença de patógenos na glândula mamária (HARMON, 1994; SOUZA et al., 2009; LOPES JÚNIOR et al. 2012).

O entendimento sobre a prevalência de patógenos específicos da mastite entre rebanhos (USDA-APHIS, 2008), aliada com a identificação de áreas com características comuns em função da CCS (SOUZA et al., 2012-2013), pode auxiliar na abordagem e desenvolvimento de programas de controle desta doença nos rebanhos leiteiros em nível de região. A construção de mapas para análises de doenças remonta o final do século XVIII (BERKE, 2005). Mais recentemente, tem sido descrita na literatura científica a utilização de técnicas de agrupamento tempo-espaço como ferramenta para composição de aglomerados em análise de variáveis contínuas como a CCS (GAY et al., 2006; 2007). Entretanto, apesar do tempo decorrido desde estes precursores, ainda não há estudos no Brasil sobre associações entre valores de CCS de rebanhos com a localização destes rebanhos e com a prevalência de patógenos contagiosos da mastite. Neste contexto, este trabalho avaliou a variação da CCS de rebanhos em função do isolamento de *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus agalactiae* no leite do tanque, estimou a prevalência destes patógenos entre rebanhos e de acordo com a distribuição destes nas regiões do estudo. O estudo também avaliou a prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* de acordo com as regiões classificadas em função da CCS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite: impacto econômico e definições

A mastite é um importante desafio para a indústria de laticínio em todo mundo (BRADLEY, 2002). Economicamente, é considerada a doença de maior custo, e responde por 38% dos gastos diretos com doenças (KOSSAIBATI e ESSLEMONT, 1997). Além dos custos envolvidos em casos de mastite clínica como tratamento, descarte de leite, descarte de animais e perda de produção, há também os custos envolvidos com a mastite subclínica, mais difíceis de mensurar, estão relacionados com a perda de produção e qualidade da matéria prima.

As decisões econômicas relativas ao controle da mastite baseiam-se no custo de casos clínicos e subclínicos em relação aos custos dos procedimentos de manejo (HALASA et al., 2008). Estas decisões podem ser tomadas em três níveis: 1) em nível de quarto mamário/vaca; 2) em nível de fazenda e 3) em nível de região/país. Decisões em nível de quarto mamário/vaca são aquelas relacionadas a uma vaca individual; por exemplo, o tratamento de casos clínicos, subclínicos ou descarte de animais. Entretanto, o tratamento individual de vacas pode ser considerado também uma decisão em nível de fazenda, pois esta medida previne novos casos de mastite. Decisões em nível de fazenda são aquelas relativas às medidas de controle e prevenção da doença (OSTERAS et al., 2005). Os benefícios destas medidas de controle colaboram com a redução na incidência de casos clínicos e subclínicos e na melhoria da qualidade do leite (DECKERS et al., 1996). Decisões em nível de regiões/país são aquelas relacionadas principalmente a campanhas que incluem coleção de dados (base de dados) de uma determinada região e população para investigar os benefícios de programas de controle da mastite (BECK et al., 1992; KEEFE et al., 1997; HALL et al., 2004). Relativo as decisões em nível de região/país, um estudo realizado na Holanda avaliou a melhor forma de sensibilizar os proprietários de rebanhos leiteiros a investirem em medidas de controle e

prevenção para mastite usando diferentes estratégias de comunicação (JANSEN et al., 2010). Estudo de prevalência de patógenos contagiosos da mastite entre rebanhos de um país ou estado também pode servir para tomada de decisão em nível de região para o controle e prevenção da doença (USDA, 2007a).

A mastite é definida como a inflamação da glândula mamária, pode ter etiologia contagiosa ou ambiental e apresentar-se sob a forma clínica ou subclínica (BRADLEY, 2002). A mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como: edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA & SANTOS, 2000).

A forma subclínica da mastite é tão grave quanto à mastite clínica devido a sua apresentação assintomática e leva a perdas que vão de 1 a 21% na produção de leite (MAGALHÃES, 2006). A mastite subclínica pode ainda acarretar alterações no teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, conteúdo de caseína e em outras características físico-químicas alterando a qualidade da matéria prima e conseqüentemente redução do rendimento dos seus subprodutos (ZAFALON, 2005).

A mastite é a doença mais comum e mais cara dos rebanhos leiteiros, causada principalmente por bactérias invasivas e outros microorganismos (WATTIAUX, 1995). O controle da mastite é mais importante do que simplesmente o tratamento de casos clínicos. Vacas acometidas pela forma subclínica da doença são reservatórios potencialmente disseminadores de microorganismos, que podem levar a infecção de outras vacas e que casos clínicos podem advir do agravamento da infecção subclínica (WATTIAUX, 1995).

Dois padrões distintos são reconhecidos na epidemiologia da mastite (BRAMLEY e DODD, 1984; BRADLEY, 2002). O primeiro padrão é contagioso e a transmissão dos microrganismos de vaca para vaca é essencial para a propagação da doença. Este padrão envolve a transmissão da doença de um animal infectado para um susceptível e os principais patógenos envolvidos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (BRAMLEY e DODD, 1984; ELVINGER e NATZKE, 1992). O segundo padrão é de caráter ambiental, sendo que microrganismos oportunistas e fatores relacionados ao ambiente e ao indivíduo colocam o animal em risco. Neste

caso, há forte interação entre microrganismos, hospedeiro e meio ambiente (SCHUKKEN e KREMER, 1996).

Apesar desta divisão clássica, estudos recentes apontam para uma dificuldade de classificação dos patógenos causadores de mastite como contagioso e ambiental, onde diversas espécies podem apresentar características tanto com perfil contagioso quanto ambiental (SCHUKKEN et al, 2012).

Os microrganismos que participam do processo de infecção da glândula mamária possuem nichos e formas de atuação diferentes e podemos classificá-los como patógenos principais e secundários (HARMON, 1994).

Patógenos principais são responsáveis por causar maiores reações inflamatórias no úbere, provocando maiores aumentos na CCS (PHILPOT e NICKERSON, 2000). Os patógenos principais mais comuns incluem o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococos e enterococos de origem ambiental. As mastites causadas por estes patógenos resultam em grandes variações na composição do leite e na CCS (HARMON, 1994). Brito et al. (1999) na Zona da Mata de Minas Gerais, isolaram em 98% dos rebanhos *Staphylococcus aureus* e em 60,4% *Streptococcus agalactiae*.

Patógenos secundários causam processo inflamatório brando, elevando a CCS de duas a três vezes em relação às glândulas mamárias não infectadas (HARMON, 1994; PHILPOT e NICKERSON, 2000). Os de importância mais relevante são *Staphylococcus* spp. *coagulase negativo* e *Corynebacterium bovis*. (HARMON, 1994).

2.2 Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) do leite é o indicador usado para avaliar e monitorar a frequência de animais e quartos mamários com mastite subclínica em programas de controle e prevenção de mastite em todo o mundo (SHUCKKEN et al., 2003). Dohoo e Leslie (1991) observaram que os valores

superiores a 200.000 células/mL foi o mais indicado para estimar uma nova infecção intramamária.

Numa glândula infectada, as células de defesa, representadas principalmente pelos neutrófilos, correspondem de 98 a 99% das células encontradas no leite (PHILPOT e NICKERSON, 1991). Estes autores demonstraram relação inversa entre a produção de leite e a CCS (Tabela 1). Quando os valores de CCS extrapolam 200.000 células/mL, observa-se aproximadamente uma queda de 2,5% na produção a cada 100.000 células/mL a mais, chegando a uma perda de até 29% na produção.

Tabela 1 - Relação entre CCS de leite de tanque, quartos mamários infectados e porcentagem na perda de produção de leite.

CCS de Leite de Tanque (x1.000 células/mL)	Quartos Mamários Infectados (%)	Perda na produção de Leite (%)
200	6	0
500	16	6
1.000	32	28
1.500	48	29

Fonte: PHILPOT e NICKERSON, 1991.

Vários fatores podem influenciar a variação da CCS de vacas em lactação; como idade, parto, período de lactação, mês e estação do ano, entre outros, porém, o estado de infecção é o principal causador pelo aumento da CCS (HARMON, 1994). Entretanto, existe diferença na intensidade do processo inflamatório de acordo com os patógenos da mastite.

No Brasil, a CCS do tanque de rebanhos bovinos passou a ser avaliada e monitorada do ponto de vista legal a partir de 2005 por meio da publicação da Instrução Normativa 51 (IN51) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002), que regulamentou o padrão de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. No final de 2011 foi publicada a Instrução Normativa 62 (IN62) (BRASIL, 2011), que veio substituir a IN 51, alterando os prazos e os limites máximos para CCS.

Os prazos e os limites para a CCS, os quais passam a ter como limite máximo 600.000 células/mL ao invés de 750.000 células/mL, para os produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a partir de 1 de janeiro de 2012, e para os produtores do Norte e Nordeste apenas em janeiro de 2013. Para os anos seguintes, até 01/01/2016 (Regiões S, SE CO) e 01/01/2017 (Regiões N e NE), haverá escalonamento de prazos e limites para a redução de CCS, para que cheguem a 400.000 células/mL, metas propostas pela IN 51 para 2011.

2.3 Patógenos causadores da mastite

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Dentre os patógenos principais da mastite, destaca-se *Staphylococcus aureus* como o principal agente etiológico da mastite bovina (SALASIA et al., 2004; SÁ et al., 2004). Seus principais sítios de localização nos animais são os quartos mamários infectados e a transmissão ocorre usualmente entre vacas durante a ordenha, e o conhecimento de sua distribuição pode ajudar na formulação de estratégias para o controle da doença (SALASIA et al, 2004). Estas características fazem o momento da ordenha o mais importante na transmissão de *S. aureus* entre vacas (BRAMLEY e DODD, 1984).

Mastites causadas por *S. aureus* podem variar de forma hiperaguda a subclínica, tendo a forma subclínica crônica com episódios clínicos como a mais frequente (QUINN et al., 2002). Casos subclínicos crônicos de mastite causada por *S. aureus* resultam atrofia do alvéolo mamário, fibrose e micro abscessos, o que limita a ação fagocítica de células e a ação de antibióticos, causando infecções profundas no tecido mamário, com episódios de liberação de bactérias dos quartos mamários infectados acompanhados de altas CCS (PYÖRÄLÄ, 1995; QUINN et al., 2002). Estas características são, provavelmente, o que torna o efeito da blitz terapia

pouco eficaz na eliminação deste patógeno, pois o acesso de antibióticos e das células de defesa ao sítio de infecção fica limitado (CRUZ et al., 2004).

Este patógeno possui uma característica importante em que algumas cepas apresentam virulência maior na glândula mamária bovina e em infecções latentes podem desencadear novos processos clínicos (ZAFALON et al., 2008). Esta virulência estaria associada à produção de coagulase pelo microrganismo, segundo os autores. Estes autores ainda verificaram que as cepas isoladas do leite apresentaram, na sua maioria, reação mais forte à prova de coagulase do que aquelas isoladas nos óstios e teteiras, contraponto os resultados de Silva et al (2000) citados naquele trabalho.

2.3.2 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae foi o primeiro microrganismo reconhecido como agente etiológico da mastite (NATZKE, 1981). O curso da infecção é semelhante ao da infecção crônica subclínica causada por *S. aureus*, com ciclos de liberação de bactérias acompanhados de altas CCS. Além disso, *S. agalactiae* produz altas CCS em indivíduos, o que influencia significativamente na CCS do rebanho (KEEFE et al., 1997). Infecções por este microrganismo aumentam a CTB (Contagem Total de Bactérias), pois os animais acometidos eliminam elevado número de bactérias no leite (LOPES JÚNIOR et al., 2012; SANTOS e FONSECA, 2000). A alta liberação de microrganismos no leite confere ao *S. agalactiae* a característica de ser uma bactéria altamente contagiosa, sendo disseminado principalmente no momento da ordenha (BRAMLEY e DODD, 1984; BARTLETT et al., 1992). Em rebanhos infectados com *S. agalactiae*, geralmente há alta prevalência de animais infectados (KEEFE, 1997).

S. agalactiae localiza-se somente na glândula mamária, com sobrevivência restrita fora do úbere e é altamente sensível à penicilina. Devido a estas características, *S. agalactiae* tem sido erradicado de rebanhos e até mesmo de alguns países (KEEFE et al., 1997). Países onde existem programas de extensão de

longa data conseguiram diminuir consideravelmente a prevalência deste patógeno (KEEFE, 2012). O objetivo final de um programa de controle de *S. agalactiae* é a erradicação (KEEFE, 2012). Mendonça et al. (2007) ressalta que, apesar da alta sensibilidade deste patógenos aos betalactâmicos, a adoção do manejo correto durante o tratamento dos animais acometidos (blitzterapia) é primordial para o sucesso de sua erradicação do rebanho.

Os fatores de virulência, normalmente associados ao *S. agalactiae*, isolados em mastites, incluem as proteínas da superfície bacteriana e as secretadas, estruturas que, direta ou indiretamente, impedem a fagocitose, propiciam a adesão e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A maioria destes fatores está presente na superfície bacteriana e na cápsula (CORRÊA et al., 2010).

Fatores associados à presença de *S. agalactiae* foram identificados como procedimentos inadequados para higiene do úbere e tetos antes da ordenha, falha na desinfecção dos tetos após a ordenha, seleção de animais para tratamento a secagem ou não realização de tratamento a secagem, limpeza inadequada do meio ambiente e uso de pano comum para limpeza dos tetos e úbere antes da ordenha (BRAMLEY e DODD, 1984; BARTLETT et al., 1992; KEEFE, 1997; SOUZA et al., 2006a; SOUZA et al., 2006b).

2.3.3 Outros patógenos da mastite

São classificados como patógenos principais, e tem a característica de serem ambientais, as enterobactérias, principalmente *Escherichia coli*, e *Streptococcus uberis*. Estes patógenos são descritos como invasores oportunistas da glândula mamária; invadem, multiplicam, estimulam resposta imune e são rapidamente eliminados. Estão predominantemente associados a casos de mastite clínica, 27% e 23%, respectivamente, enquanto os patógenos contagiosos aparecem com 18% de implicação nos casos (BRADLEY, 2002).

Outros patógenos, classificados como oportunistas, também são causadores de mastite. Apesar da menor importância em relação aos agentes descritos

anteriormente, são constantemente citados na literatura. São exemplos as mastites causadas por leveduras (fungos) e algas (PHILPOT e NICKERSON, 1991).

2.4 Enfoques epidemiológicos voltados para saúde da glândula mamária

O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade formada pelo animal, pelo agente etiológico e pelo meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial. Como tal, a prevenção e controle em rebanhos ou população de rebanhos dependem do conhecimento prévio sobre o padrão de infecção, a categoria de animais onde há maior ocorrência da doença, a metodologia de amostragem de animais e rebanhos para realização de diagnósticos bem como as vantagens e desvantagens destes métodos de diagnóstico que só se tornam possíveis por meio de estudos epidemiológicos da situação (HURLEY & MORIN, 2001, citado por PRESTES et al., 2002). Um exemplo de estudo epidemiológico que pode auxiliar na adoção de medidas de controle para uma população de rebanhos é o de fatores de risco para mastite subclínica (COENTRÃO et al., 2008). Foram identificados, por estes autores, como fatores de risco para ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras o manejo inadequado, a inexistência de treinamento dos ordenhadores, a não utilização de serviços laboratoriais para identificação dos patógenos e o uso de equipamentos de ordenha sem manutenção periódica.

O papel da epidemiologia e economia veterinária em programas regionais ou nacionais de controle de doenças animais em todo mundo aborda as doenças zoonóticas, epidêmicas, endêmicas e as doenças veiculadas por alimentos (toxinfecções alimentares) (PERRY, 2001). Quando se trata de doenças endêmicas, procura-se escolher entre as opções estratégicas mais adequadas, para o caso de decidir pelo controle ou erradicação da doença. No caso da mastite, a estratégia principal é o controle, porém existe a possibilidade de erradicação de *S. agalactiae* pelo fato desta bactéria ser viável somente na glândula mamária e ser sensível a maioria dos antibióticos (KEEFE, 1997; CRUZ et al., 2004).

O conhecimento gerado a partir de estudos epidemiológicos específicos realizados em diferentes países, e no Estado de Minas Gerais, sobre o padrão de infecção, prevalência de patógenos contagiosos da mastite (*S. aureus* e *S. agalactiae*) em rebanhos bovinos leiteiros, avaliação de métodos de diagnóstico de indivíduos e rebanhos, identificação dos fatores de risco para mastite, distribuição temporal e espacial de agentes contagiosos da mastite e análise econômica de medidas sanitárias em nível de rebanho e região podem ser utilizados no aprimoramento dos programas de controle e prevenção da mastite (FERREIRO et al., 1981; BARKEMA et al., 1998, BARKEMA et al., 1999, BRITO, et al., 1999; GIBBONS-BURGENER et al., 1999; OTT e NOVAK, 2001; SOUZA et al., 2005; KARIMURIBO et al., 2006; RIEKERINK et al., 2006; PIEPERS et al., 2007; USDA, 2007a).

2.4.1 Estudos de prevalência

a. Prevalência de *Staphylococcus aureus*

Em estudo conduzido por Zafalon et al. (2005) foi encontrada a prevalência de 44,7% para estafilococos coagulase positivo e 30,3% para *Corynebacterium bovis* no rebanho estudado, composto de vacas leiteiras 7/8 de holandês, variedade preto e branco. Nos períodos de índice pluviométrico maior, notou-se aumento de isolamento de *S. aureus* (ZAFALON et al., 2008). Estudando *S. aureus* em amostras de leite de rebanhos bovinos do noroeste do Rio Grande do Sul, Coppola et al (2010), observaram em 43,1% das amostras a presença deste patógeno, sendo o microrganismo mais prevalente naquele trabalho. Outros autores obtiveram resultados semelhantes em relação à predominância deste patógeno no isolamento de amostras de leite. Estudo de Souza et al (2009) verificou a variação da CCS de acordo com o patógeno envolvido e observaram menor prevalência de *S. aureus* (30,2%) em relação ao *Corynebacterium* spp (31,6%) na população estudada.

Estudos em vacas primíparas mostraram que, naquela população, predominou a infecção por estafilococos coagulase negativo (69,1%), considerados patógenos secundários (LAFFRANCHI et al, 2001).

Andrade et al. (1998), pesquisando mastite subclínica por meio do CMT em rebanhos compostos, na sua maioria, por animais da raça Holandesa, obtiveram, nas amostras positivas, 30,2% de presença *S. aureus*. Estudo realizado por Brito et al. (1999), com 48 rebanhos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais, identificou que em 47 (98,0%) havia pelo menos um animal infectado por *S. aureus*, sendo que em 37 deles havia até 20% de quartos mamários infectados. No Estado de São Paulo, um levantamento isolou *S. aureus* em 6,7% das amostras individuais de leite e 10,8% das amostras de leite de tanque nos 37 rebanhos estudados (FAGUNDES et al., 2010).

S. aureus foi isolado em 31,8% das amostras coletadas de vacas com mastite subclínica ou clínica num universo de 2671 amostras (CRUPPE et al., 2008). Riekerink et al. (2006), isolaram 74% de *S. aureus* na população estudada. Segundo os autores, para real determinação da presença do *S. aureus*, é necessária mais de uma amostra de leite de tanque. Estudo de prevalência realizado nos Estados Unidos abrangeu os 17 principais estados produtores, onde foi isolado *S. aureus* em 43% de 534 rebanhos com mais de trinta vacas em lactação (USDA-APHIS, 2008).

b. Prevalência de *Streptococcus agalactiae*

Entre 1976 e 1982, estudo realizado nos Estados do Mississippi e Massachusetts, Estados Unidos, mostrou que a prevalência média de animais infectados por *S. agalactiae* dentro de rebanhos variou de 39,5 a 44,7% (KEEFE, 1997). Em rebanhos com CCS maior que 800.000 células/mL, 80% das vacas com CCS superior a 500.000 células/mL estavam infectadas com *S. agalactiae* (KEEFE, 1997). No Estado de Ohio, Estados Unidos, de 48 rebanhos, 27 (56%) possuíam no mínimo uma vaca infectada por *S. agalactiae*, onde as médias de quartos e vacas infectadas foram de 4,1 e 10,0%, respectivamente (BARTLETT et al., 1992).

Em uma população de 258 rebanhos localizados em Prince Edward Island, no Canadá, a prevalência de *S. agalactiae* foi de 1,6% (RIEKERINK et al, 2006). Estudo conduzido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para avaliar a prevalência de *S. agalactiae* entre os rebanhos mostrou que pelo menos uma vaca em 2,6% dos 534 rebanhos avaliados estava infectada por *S. agalactiae* (USDA-APHIS, 2008).

Em países com indústrias de laticínios emergentes, a prevalência dos patógenos contagiosos da mastite entre rebanhos pode ser bastante elevada. No Brasil, Colômbia e Uruguai foram encontrados valores de 60%, 42% e 11%, respectivamente para o *S. agalactiae* (DUARTE et al., 2004; KEEFE et al, 2011 e GIANNEECHINI, 2002 citados por KEEFE et al, 2012).

Das amostras de rebanhos analisadas por Souza et al. (2009), em 21,1% delas foi isolado *S. agalactiae*. Em 2.671 amostras coletadas de vacas com mastite subclínica ou clínica em rebanhos leiteiros brasileiros, 16,3% apresentaram crescimento de *S. agalactiae* (CRUPPE et al., 2008). Em rebanhos predominantemente da raça Holandesa no Estado de Goiás, foi observado que, 1,6% dos animais reagentes ao Califórnia Mastitis Test (CMT) foram positivos ao isolamento de *S. agalactiae* (ANDRADE et al., 1998). A presença de *S. agalactiae* foi observada em 29 (60,4%) rebanhos, e em 24 destes rebanhos a média de quartos infectados foi de 3,6% (BRITO et al., 1999).

c. Relação entre patógenos da mastite e contagem de células somáticas

A infecção intramamária foi o principal fator responsável pelo aumento da CCS, para amostras de leite individuais de vacas leiteiras, e patógenos contagiosos da mastite tem relação direta com este fato. *S. agalactiae* foi o causador da maior elevação, com uma média aritmética de 1.520.000 células/mL e 50% das amostras, isoladas com o patógeno, tinham valor igual ou maior que 923.000 células/mL (SOUZA et al., 2009). Bradley (2002), mostrou a variação da CCS do rebanho em relação a presença de patógenos da mastite (Tabela 2).

Tabela 2 – Isolamento de amostras de leite de animais com mastites provenientes de rebanhos com baixa e alta contagem de células somáticas de leite de tanque (CCSLT).

	Alta	Baixa
CCSLT (células/mL)	> 700.000	< 150.000
Incidência de mastites (% / ano)	35	51
Isolados (% do total)		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	41,5	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,3	2,2
Outros estreptococos	12,6	12,3
Coliformes	8,0	43,5
Negativos para cultura	8,8	28,6

Fonte: adaptado de BRADLEY, 2002

O uso da CCS para monitorar a saúde da glândula mamária é uma ferramenta valiosa para estimar vacas infectadas por *S. aureus* e *S. agalactiae* (KEHRLI, JR. e SHUSTER, 1994). *S. aureus* e *S. agalactiae* foram determinantes para os altos valores de CCS, sendo este último o de influência mais notória (LOPES JÚNIOR et al., 2012).

A alta CCS de leite de tanque é associada com maior prevalência de mastite subclínica causada por *S. aureus* e *S. agalactiae* (RIEKERINK, 2006). A associação positiva entre rebanhos onde houve isolamento de *S. agalactiae* e também apresentavam alta CCS de tanque foi observada por Keefe (1997).

O isolamento e importância desses agentes em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de Minas Gerais, bem como a variação da CCS em função dos patógenos contagiosos da mastite, foram relatados por diversos autores (HARMON, 1994; BRITO et al., 1999; DJABRI et al., 2002; SOUZA et al., 2009).

2.4.2 Importância do *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* para a pecuária leiteira

Devido a importância do *S. aureus* e *S. agalactiae* para a pecuária leiteira, foi definido pelos produtores e profissionais da área dos Estados Unidos a necessidade de realizar estudo de prevalência em nível de rebanho para estes agentes (USDA-APHIS, 2008). Os resultados do estudo mostram que em 43,0% e 2,6% dos rebanhos havia a presença de pelo menos uma vaca infectada por *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente. De acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a média de CCS dos rebanhos bovinos variou de 296.000 a 262.000 células/mL no período de 2005 a 2008 (Tabela 3). Neste mesmo período, o percentual de rebanhos com média anual de CCS superior a 600.000 células/mL e 400.000 células/mL variou de 25,8% a 22,4% e de 9,2% a 7,1%, respectivamente. Estes percentuais de rebanhos com CCS superior a 600.000 células/mL e 400.000 células/mL pode ser considerado o reflexo da prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* nos rebanhos norte-americanos (USDA, 2007b; UDDER, 2009).

Tabela 3: Valores médios da contagem de células somáticas (CCS) e frequência de rebanhos localizados nos Estados Unidos com contagens superiores a 400.000 células/mL e 600.000 células/mL no período de 2005 a 2008.

Ano	Contagem de células somáticas (x1.000 células/mL)		
	Média	> 400	> 600
2005	296	25,8	9,2
2006	288	25,2	8,3
2007	276	24	7,6
2008	262	22,4	7,1

Fonte: adaptado de UDDER, 2009.

Neste estudo também foi observada relação entre o tamanho dos rebanhos e prevalência de *Mycoplasma spp.*, sendo que rebanhos com mais de 500 vacas em lactação apresentaram maior prevalência do patógeno em relação aos rebanhos com número menor de vacas em lactação (Figura 1). Não houve variação significativa para a prevalência entre rebanhos em função do tamanho para *S. aureus* e *S. agalactiae*.

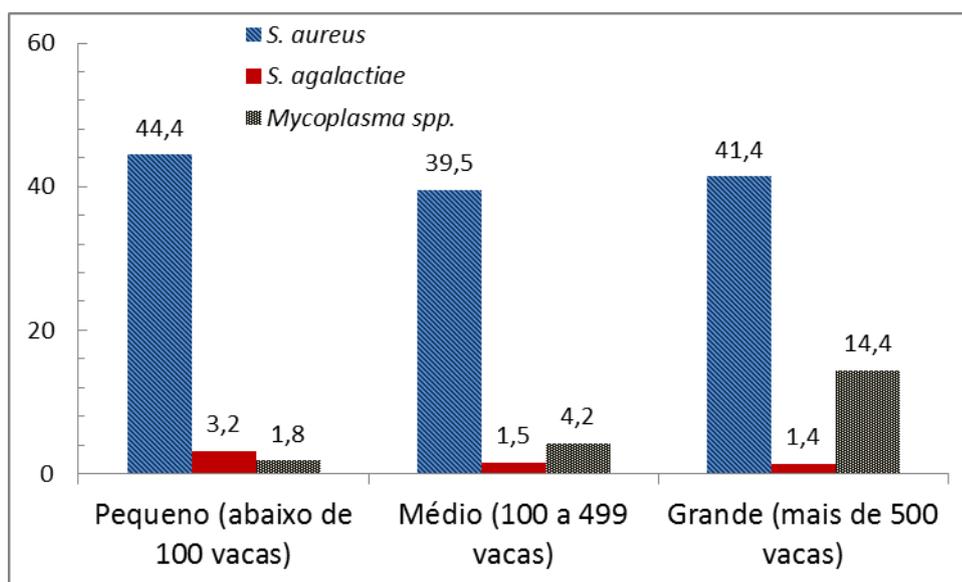


Figura 1 – Prevalência de patógenos contagiosos da mastite de acordo com tamanho do rebanho.

Fonte: adaptado de USDA 2008

Estudo realizado em Minas Gerais, Brasil, em 2010, observou que em relação à localização dos rebanhos naquele Estado não houve diferença significativa quanto à variação da CCS; mas, em relação ao tamanho do rebanho, foi observado que aqueles com número maior de vacas em lactação apresentaram índices menores de CCS em relação a rebanhos com menor número de vacas em lactação (Tabela 4) (OLIVEIRA, no prelo). Dados de rebanhos localizados na região Sudeste do Brasil mostraram que não houve melhoria significativa em relação as médias anuais de CCS e os percentuais de rebanhos com média anual de CCS superior a 400.000 células/mL no período de 2006 a 2009. Neste período, a média de CCS dos rebanhos variou de 376.000 a 479.000 células/mL e o percentual de rebanhos com contagens superiores a 400.000 células/mL variou de 9,4 a 16,5% (SOUZA et al., 2010).

Tabela 4 - Valores médios da contagem de células somáticas (CCS) para os rebanhos em relação à localização no Estado de Minas Gerais e número de animais em lactação (Março/2009 a Fevereiro/2010).

Variável	Categorias	Média CCS (x 1.000 células/mL)
Mesoregião	Zona da Mata e Campo das Vertentes	673
	Metropolitana de BH	517
	Sul Sudoeste	507
	Triângulo / Alto Parnaíba	457
Vacas em Lactação	< 21	721
	21 a 40	498
	41 a 80	557
	> 80	421

Fonte: OLIVEIRA (no prelo).

2.4.3 Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico microbiológico para isolamento de patógenos da mastite

A sensibilidade é definida como a habilidade do teste para identificar corretamente indivíduos e/ou rebanhos positivos e especificidade como a habilidade do teste para identificar corretamente indivíduos e/ou rebanhos negativos (KLEIN e COSTA, 1987). A sensibilidade e a especificidade de um teste são necessárias para se determinar a prevalência real de uma doença e estas podem ser determinadas ou estimadas (RIEKERINK et al., 2006). A sensibilidade e especificidade dos testes de cultura de leite variam de acordo com vários fatores. Por exemplo, o microrganismo pesquisado, o tipo de amostra (de quartos mamários, de vacas ou de tanque), a condição da amostra (fresca ou congelada), duração da

infecção, o padrão de liberação do patógeno envolvido, o meio utilizado para a cultura, o volume de leite e frequência de amostragem (KELTON e GODKIN, 2000).

Dados do *New York State Cattle Health Assurance Program*, EUA, mostram que a sensibilidade do teste para cultura de uma única amostra de leite de tanque é 90% e 75% para *S. agalactiae* e *S. aureus*, respectivamente (NYSCHAP, 2002). Para cultura de amostra individual de vacas, os valores de especificidade e sensibilidade foram aproximadamente 70%. Entretanto, a melhoria da especificidade do método aumentou para aproximadamente 90% quando foram realizadas culturas de múltiplas amostras do mesmo animal coletadas em períodos subsequentes (NYSCHAP, 2002). Amostras de leite congeladas durante curtos períodos têm a vantagem de aumentar a probabilidade de identificação de patógenos contagiosos da mastite, melhorando então a sensibilidade do método diagnóstico (VILLANUEVA, 1991, SHUCKKEN, 1989 apud KELTON e GODKIN, 2000).

A variabilidade existente em outros métodos para avaliar a saúde da glândula mamária, como a CCS e exames microbiológicos de animais e rebanhos, dificulta o objetivo de avaliação da utilidade da cultura do leite de tanque (GODKIN e LESLIE, 1993). Uma cultura de amostra única de leite de tanque é recomendada por ter uma alta especificidade, mas uma baixa sensibilidade como um teste para patógenos contagiosos da mastite. Com isso, alguns rebanhos infectados não são detectados, mas poucos rebanhos são erroneamente chamados de infectados (GODKIN e LESLIE, 1993). Esses autores mencionaram, porém, que a utilização de cultura de amostra de leite de tanque, como rotina de procedimento de monitoramento para a mastite, é dificultada pela carência de uma aplicação uniforme, metodologia de teste e amostragem bem documentados e inconsistência nos métodos de análise do teste (incluindo a escolha de uma cultura padrão para comparação). Sugeriram ainda que métodos epidemiológicos fossem utilizados para avaliação dos testes determinando a especificidade e sensibilidade.

Brito et al. (1998) mostraram que o exame microbiológico do leite do tanque pode ser empregado nas condições brasileiras, desde que sejam seguidos os critérios de uso de meios seletivos, coleta adequada da amostra, análise de pelo menos três amostras consecutivas e identificação criteriosa das espécies de patógenos envolvidos, especialmente com relação a *S. aureus* e *S. agalactiae*.

2.5 Análise espacial de indicadores de saúde da glândula mamária

Compreender a distribuição espacial de dados ocorridos no tempo e espaço constitui hoje grande desafio para a elucidação central de diversas áreas do conhecimento, seja de geologia, de saúde, de agronomia, de ambiente, entre outras (VIEIRA, 2000).

A estatística espacial continua sendo uma nova fronteira na pesquisa epidemiológica veterinária (MARTIN, 2004 apud BERKE, 2005). Na literatura, a aplicação de métodos de análise espacial é reconhecida há muito tempo como ferramenta básica na descrição e análise de eventos em saúde, área conhecida como Epidemiologia Espacial (CARVALHO e SOUZA-SANTOS, 2005). Tais estudos vêm apresentando crescente utilização por parte dos pesquisadores, devido à disponibilidade dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG) de baixo custo e recentes avanços metodológicos no campo da estatística (CARVALHO e SOUZA-SANTOS, 2005).

Os primeiros exemplos de utilização de mapeamento para doenças remontam ao surto de febre amarela em New York em 1796 e casos de cólera ocorridos em Londres em 1854 (BERKE, 2005). Vários modelos de representação de mapas foram usados ao longo dos anos, tentando representar de maneira eficiente a distribuição de doenças ocorridas numa região. Estes métodos de mapeamento têm como objetivo fornecer estimativas locais do risco da população exposta em relação ao risco da população não exposta ou menos exposta em relação a uma doença (BERKE, 2005). O mapa de risco relativo gerado quantifica o impacto do fator de risco da doença, quando este é conhecido, e ajuda a demonstrar a sua variação geográfica (BERKE, 2005).

Em geral, a análise espacial é composta por procedimentos iniciais, incluindo métodos genéricos de análises exploratórios associados à apresentação visual dos dados sob a forma de gráficos e mapas e a identificação do padrão de dependência espacial do fenômeno estudado. Estes procedimentos permitem descrever a distribuição das variáveis de estudo e identificar situações atípicas, não só em relação ao tipo de distribuição, mas também aos vizinhos, e buscar a existência de

padrões na distribuição espacial e de dependência espacial presente no fenômeno (CÂMARA et al.; 2004).

Assim, todas as amostras retiradas de algum ponto no espaço ou no tempo devem ser consideradas como parte de uma função contínua, e são pontos discretos desta função. Estas se relacionam com seus vizinhos, mesmo que não se conheça exata e matematicamente qual é a expressão para este relacionamento. Nessa condição, pode-se dizer que amostras separadas por pequenas distâncias são mais parecidas do que amostras separadas por grandes distâncias (VIEIRA, 2000;2002). Quando há uma variação espacial no risco, a doença tende a se agrupar, formando aglomerados, onde a população terá um nível maior de exposição em relação à de outras áreas (BERKE, 2005).

Desta forma, a geoestatística incorpora, além da análise da distribuição estatística dos dados coletados, as relações espaciais entre estes, na forma de correlação entre os pontos amostrados (SRIVASTAVA,1996, apud VALLADARES et al., 2009).

A gestão da pecuária leiteira vem mudando com o desenvolvimento de novas tecnologias (OLEGGINI et al, 2001). Diante da recente evolução da produção pecuária, é crescente a preocupação dos organismos de saúde animal em todo o mundo com a propagação e controle de doenças emergentes ou endêmicas nos rebanhos (USDA-APHIS, 2008; ELY et al., 2003). Baseado no exposto verifica-se a necessidade de incorporar novas tecnologias, capazes de fornecer dados que podem ser usados para monitorar o estado sanitário dos rebanhos (GAY et.al., 2006).

Recentemente, no âmbito da medicina veterinária, tem sido utilizada a aplicação de técnicas de análise espacial como ferramenta para identificação de aglomerados. No estudo conduzido por Gay et al. (2006), os autores propuseram um novo método para agrupamento espacial, o que permite combinar dois campos importantes da vigilância epidemiológica: a análise clássica de fator de risco, e a análise espacial da doença. Com isso, foi observada a dependência espacial entre a alta CCS e os fatores de risco como o número de partos, período do ano, e tamanho do rebanho, e a identificação de aglomerados de CCS (GAY et al., 2006). No ano seguinte, os mesmos autores avaliaram a variação da CCS de acordo com regiões

em um período de cinco anos e verificaram que o modelo foi capaz de identificar diferenças regionais de CCS em áreas de baixa densidade e com população heterogênea (GAY et al., 2007). Segundo Gay et al. (2006) e Ely et al. (2003), a identificação de aglomerados de CCS poderia ter múltiplos usos, como ferramenta, auxiliando técnicos locais na gestão da saúde da glândula mamária por meio do monitoramento do risco para mastite, e poderia ser útil para identificar áreas e regiões com maior ou menor adoção das medidas de controle e prevenção da mastite.

Souza et al. (2012) verificaram que a análise espacial pode ser uma ferramenta viável para avaliação dos indicadores de qualidade composicionais (gordura, lactose e extrato seco desengordurado) e higiênico-sanitários do leite (CCS e contagem total de bactéria). O uso da análise espacial para indicadores de qualidade do leite em 217 rebanhos na bacia leiteira de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, mostrou a existência de dependência espacial para gordura, lactose, extrato seco desengordurado, CCS e contagem total de bactérias. Estudo conduzido em região do Estado do Espírito Santo, na Região Sudeste do Brasil, com 860 rebanhos, mostraram resultados semelhantes (SOUZA et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a relação entre a análise espacial da contagem de células somáticas e a prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* entre rebanhos bovinos.

3.2 Objetivos específicos

Estimar a prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* entre os rebanhos bovinos no período de 2011 a 2012.

Avaliar o efeito do tipo de patógeno em leite de tanque sobre a CCS de rebanhos bovinos.

Identificar áreas com características comuns em relação a contagem de células somáticas nos rebanhos bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População alvo e área do estudo

A população estudada foi composta por 112 rebanhos leiteiros vinculados a Associação de Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais (ACGHMG). Estes rebanhos totalizam aproximadamente 6.000 vacas em lactação submetidas ao controle leiteiro oficial. Os rebanhos localizavam-se nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em uma área de aproximadamente 300.000 km².

4.2 Obtenção das coordenadas geográficas

As coordenadas geográficas das propriedades foram obtidas por meio de equipamentos eletrônicos com GPS (*Global Position System*) da marca Garmim modelo GPSTopo 60 CSX, sendo seus pontos posteriormente georreferenciados para o estudo de geoestatística. Todas as coordenadas geográficas obtidas foram transformadas para UTM (Universal Transversa de Mercator). A opção pela utilização deste sistema de coordenadas geográficas deve-se por ser baseado no plano cartesiano (eixo x,y) e usa o metro (m) como unidade para medir distâncias e determinar a posição de um objeto. Estas distâncias são usadas para realização da geoestatística e para geração do mapa de isolinha para definição dos limites de áreas com características comuns em termos de CCS do rebanho através do programa de informática para geoestatística ArcGIS (ESRI, 2005).

4.3 Estratificação da área de estudo e plano amostral

A área de localização destes rebanhos foi dividida em duas regiões, sendo a Região 1 ao norte e a Região 2 ao sul. O critério usado para divisão da área de estudo em duas regiões foi o número de rebanhos por região e distância entre os rebanhos. A Região 1 possui menor número de rebanhos em relação a Região 2 e estes rebanhos estavam localizados mais distantes entre si. Em contrapartida, a Região 2 possui maior número de rebanhos em relação a Região 1 e estes rebanhos estão localizados mais próximos entre si. O número de rebanhos observados de acordo com a Região 1 e 2 foi 42 e 70, respectivamente.

4.4 Amostragem para estudo de prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae*

Para determinar o número de rebanhos para coleta de amostras do leite do tanque para isolamento e identificação de *S. aureus* e *S. agalactiae*, foi utilizada a amostragem aleatória simples estratificada por região para população finita (FRANKENA e GRAAT, 1997). Desta forma, foi calculado o número de rebanhos necessários para Região 1, Região 2, Região de alta CCS e Região de baixa e média CCS com base na fórmula a seguir:

$$n = Z^2_{(\alpha/2)} \cdot p \cdot (1-p) \cdot N / E^2 \cdot (N-1) + Z^2_{(\alpha/2)} \cdot p \cdot (1-p) \quad (1)$$

onde as variáveis são:

n - tamanho da amostra;

N - tamanho da população;

Z - valor de Z padronizado para intervalo de confiança de 95%;

α - intervalo de confiança (100- α);

p - proporção estimada de rebanhos com presença de *S. aureus* e *S. agalactiae*;

β - erro amostral

Para cálculo do tamanho da amostra, os valores de entrada estão apresentados na Tabela 5, assim como as informações sobre o número total de rebanhos e número de rebanhos amostrados de acordo com as regiões.

Tabela 5– Valores de entrada para cálculo da amostra de acordo com as regiões de estudo, número de rebanhos necessários para o estudo de prevalência, número de rebanhos amostrados e distribuição de freqüência dos rebanhos.

Dados de entrada para cálculo da amostra	Região			
	1	2	Alta CCS (> 600mil células/mL)	Média e baixa CCS (< 600mil células/mL)
N	42	70	35	77
Z	1,96	1,96	1,96	1,96
α	0,05	0,05	0,05	0,05
p	0,50	0,50	0,50	0,50
β	0,15	0,15	0,15	0,15
n	14	19	13	20
NRA	16	24	13	27
PRA	38,1	34,3	37,1	35

N - tamanho da população; Z - valor de Z padronizado para intervalo de confiança de 95%; α - intervalo de confiança (100- α); p - proporção estimada de rebanhos com presença de *S. aureus* e *S. agalactiae*; β - erro amostral; n - tamanho da amostra; NRA – número de rebanhos amostrados; PRA – percentual de rebanhos amostrados dentro da região

4.5 Obtenção de amostras de leite do rebanho para exames microbiológicos

Dos quarenta rebanhos selecionados aleatoriamente dentro da população estudada, foi coletada, pela equipe da Embrapa e da ACGHMG, uma amostra de leite do tanque, com o objetivo de isolar e identificar *S. aureus* e *S. agalactiae*. Esta

amostra, de aproximadamente 20 mL, foi obtida a partir de coletores esterilizados de aço inoxidável, diretamente do tanque de resfriamento após homogeneização. O volume foi acondicionado em frascos de vidros esterilizados, colocados, imediatamente, em recipiente com gelo e levados ao laboratório de microbiologia da EMBRAPA – Gado de Leite em Juiz de Fora para exame microbiológico em temperatura entre 0,0°C e 4,0°C. No laboratório, as amostras foram estocadas a temperatura de -4°C para serem testadas em bateria.

4.6 Obtenção de amostras de leite dos tanques dos rebanhos para contagem de células somáticas

As amostras de leite dos tanques dos rebanhos foram coletadas pelos controladores oficiais da ACGHMG no momento do controle leiteiro e realizadas de acordo com Brito et al. (2007). A CCS foi realizada nos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) (Brasil, 2002a) pela metodologia de citometria de fluxo de acordo com a International Dairy Federation - IDF (MILK..., 1995). Foi calculado para cada rebanho a média aritmética da CCS dos meses relativo ao período de março de 2011 a fevereiro de 2012 (12 meses). Todos os rebanhos com histórico de CCS, compilados e organizados através do Relatório 4 do “Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros”, gerado pela ACGHMG e que foram georreferenciados forneceram as informações relacionadas às médias aritméticas da CCS. Ao todo foram 67 rebanhos que tiveram seus dados incluídos no estudo.

4.7 Isolamento e identificação de *S. aureus* e *S. agalactiae*

As amostras de leite de cada rebanho foram semeadas nos meios de cultura seletivos ágar TKT (Merck), ágar sal manitol (Biobrás). As leituras das placas foram

feitas após 24 e 48 horas de incubação a 37°C. Colônias com características culturais de *S. agalactiae* no ágar TKT foram identificadas pela reação positiva de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), hidrólise do hipurato de sódio, crescimento variável em meio contendo 6,5% de NaCl e reação negativa no teste de hidrólise da esculina. Para facilitar identificação das colônias de *S. agalactiae* no ágar TKT, as placas, após 24 e 48 horas de incubação, foram examinadas sob luz ultravioleta (365 nm). Nessas condições, a esculina fluoresce e as colônias que hidrolisam a esculina aparecem escuras (HIGGS & BRAMLEY, 1981 apud BRITO, 1998).

Colônias amarelas e com halo amarelo nas placas de ágar sal manitol foram posteriormente identificadas como *S. aureus* pela produção de coagulase, reação fermentativa no meio de Hugh & Leifson e produção de acetoina. Os testes usados para a identificação de *S. agalactiae* e *S. aureus* foram selecionados de acordo com Harmon et al. (1990) e executados de acordo com Cowan e Steel (1974, apud BRITO et al , 1998).

4.8 Cálculo da prevalência aparente e prevalência real entre rebanhos para *S. aureus* e *S. agalactiae* e intervalos de confiança

A prevalência real para *S. aureus* e *S. agalactiae* foi calculada baseada na prevalência aparente, sensibilidade e especificidade para isolamento destes agentes a partir de uma amostra do leite do tanque de expansão de estudo prévio realizado no Brasil (BRITO et al., 1999). O cálculo da prevalência aparente (PA) e prevalência real (PR) foram baseados nas seguintes fórmulas:

$$PA = \text{N}^\circ \text{ amostras com isolamento de } S. \text{ aureus ou } S. \text{ agalactiae} / \text{número total de amostras} \quad (2)$$

$$PR = (PA + SPC - 1) / (SEN + SPC - 1) \quad (3)$$

Onde

SEN - sensibilidade do teste

SPC – especificidade do teste

Cálculo do intervalo de confiança de 95% para as prevalências aparente e real

$$IC_{95\%} = p \pm 1,96.((p.(1-p))/n)^{(1/2)}$$

Onde:

IC_{95%} - intervalo de confiança da proporção com nível de confiança de 95%

p – prevalência aparente ou real

n – número de amostras testadas

4.9 Análise estatística

Para caracterização dos rebanhos foram calculadas as estatísticas descritivas (média, desvio-padrão, primeiro quartil, mediana, terceiro quartil, mínimo e máximo) para o número de vacas no controle leiteiro, percentual de vacas na primeira lactação, intervalo entre partos, para produção em 305 dias de lactação e da CCS do rebanho. Foi realizada uma distribuição de frequência para a CCS do rebanho em quatro categorias: até 250.000 células/mL, de 251.000 a 400.000 células/mL, de 401.000 a 750.000 células/mL e acima de 750.000 células/mL.

As médias e medianas da CCS dos rebanhos foram comparadas por meio da análise de variância (ANOVA) e Teste da mediana. Para comparar as médias da CCS dos rebanhos de acordo com os resultados de isolamento dos patógenos por meio da ANOVA foi necessário realizar a normalização da distribuição por meio da transformação logarítmica na base 10.

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado empregando-se o Programa Epi-Info (CDC–WHO, version 6.04b,1997), para avaliar a associação entre CCS dos

rebanhos superior a 400.000 células/mL e o resultado do isolamento de *S. aureus* ou *S. agalactiae* para comparar as prevalências entre as regiões da área estudada.

4.10 Análise geoestatística

As informações utilizadas para análise geoestatística consideram a hipótese de auto correlação ou dependência espacial entre os dados georreferenciados. Para verificar a dependência espacial das variáveis, interpolar dados e elaborar os mapas, foi empregada a análise geoestatística segundo Vieira (2000). Foram construídos semivariogramas, partindo das pressuposições de estacionariedade da hipótese intrínseca e do cálculo da semivariância $g(h)$ estimada pela equação 4:

$$g(h) = \frac{1}{2N(h)} \cdot \sum_{i=1}^N [Z^N(x_i) - Z(X_i + h)]^2 \quad (4)$$

em que $N(h)$ é o número de pares dos valores medidos $Z(x_i)$, $Z(x_i+h)$, separados por um vetor h . É esperado, segundo Vieira (2000), que medições localizadas próximas sejam mais parecidas entre si do que aquelas separadas por grandes distâncias, isto é, que aumente $g(h)$ com a distância h até um valor máximo, no qual se estabiliza em um patamar correspondente à distância limite de dependência espacial, sendo o alcance. Medições localizadas a distâncias maiores que o alcance terão distribuição aleatória, razão pela qual serão independentes entre si. Os semivariogramas com dependência espacial foram ajustados com o modelo matemático de melhor correspondência. Os programas computacionais e procedimentos para construção e ajuste do modelo do semivariograma foram desenvolvidos por Vieira et al. (2002).

Calculou-se o grau de dependência espacial (GD), que é a proporção em porcentagem do *partial sill* (C_1) em relação ao patamar (C_0+C_1) (Equação 5), sendo, segundo Zimback (2001) e Trangmar et al. (1985), dependência fraca <25%, dependência moderada de 26% a 75% e dependência forte > 75%.

$$GD = \left(\frac{c^2}{c_0 + c_1} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Uma vez que o semivariograma representa a variabilidade espacial dos dados, a análise geoestatística permitiu a análise dos dados, comparando-se os parâmetros de ajuste dos semivariogramas para cada uma das variáveis estudadas. Havendo dependência espacial demonstrada pelo semivariograma, podem-se estimar valores para qualquer outro local que não foi amostrado, usando-se a krigagem, que, segundo Vieira et al. (2002), estima os valores com condições de não tendenciosidade e com desvios mínimos em relação aos valores conhecidos, ou seja, com variância mínima (Equação 6):

$$\sum_{j=1}^N \tau_j y(X_i, X_j) + \mu = y(X_i + X_0), i = 1, N \quad \sum_{j=1}^N \tau_j = 1 \quad (6)$$

Em que $\gamma(X_i, X_j)$ é a semivariância estimada, usando o modelo ajustado ao semivariograma, correspondente à distância entre os pontos localizados na posição X_i e X_j e $\gamma(X_i, X_0)$ é a semivariância correspondente à distância entre os pontos localizados na posição X_i e X_0 . Valores de peso 1 e um valor do multiplicador de Lagrange, m , associado com a minimização da variância, são gerados e com os valores de 1_i podem-se estimar valores (Z) no espaço amostrado para qualquer posição X_0 . Com os valores estimados (Equação 7), foram construídos mapas de isolinhas, em função da coordenada geográfica através do sistema de informação geográfica ArcGIS (ESRI, 2005). O uso da krigagem como interpolador permite mostrar a variabilidade espacial de determinada área, pois a partir dela é possível a construção de mapas de isolinhas.

$$Z^*(X_0) = \sum_{i=1}^N \tau_j \cdot Z(X_1) \quad (7)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estratificação da área de estudo

Após georreferenciamento das propriedades foi gerado mapa ilustrando a distribuição das propriedades dentro da área do estudo (Figura 2). A divisão entre Região 1 e Região 2 também está representada nesta figura. O número de rebanhos observados de acordo com a Região 1 e 2 foi 42 e 70, respectivamente.



Figura 2 – Localização dos rebanhos de acordo com as regiões previamente definidas ao norte (Região 1) e ao sul (Região 2) da área estudada utilizando como limite entre as regiões a linha verde

5.2 Características dos rebanhos de acordo com a contagem de células somáticas

Estatísticas descritivas do número de vacas no controle leiteiro, percentual de vacas no rebanho na primeira lactação, intervalo entre partos, média da produção (kg) em 305 dias de lactação dos rebanhos da ACGHMG estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6– Análise descritiva do primeiro quartil, terceiro quartil, média e desvio-padrão, número de vacas no controle leiteiro, percentagem de vacas na primeira lactação, intervalo entre partos, média de produção de leite em 305 dias e média aritmética.

Característica de rebanho (n=67)	1° IQ	3° IQ	Média	DP
Número de vacas no controle leiteiro	26	91	70,1	78,6
% vacas na primeira lactação	33,5	54,6	44,2	16,5
Intervalo entre partos (dias)	446	533	490,7	98,5
Média de produção 305 DEL (Kg)	7.087	9.088	7.929,1	1.810,8
MACCS (x 1.000)	353	671	540	297

Legenda: IQ – intervalo quartil, DP – desvio padrão, DEL – dias em lactação, MACCS – média aritmética da contagem de células somáticas; n – número de rebanhos.

Características relacionadas ao padrão racial, tipo de ordenha, sistema de produção, número de vacas no controle leite por rebanho, percentual de vacas na primeira lactação, intervalo entre partos, média da produção em 305 dias de lactação e média aritmética da contagem de células somáticas por rebanho foram obtidas de 67 rebanhos, escolhidos aleatoriamente, por meio do Relatório 4 do

“Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros”, gerado pela ACGHMG e disponibilizado para os associados.

Os rebanhos analisados apresentam altos níveis de tecnificação, tendo em 100% das propriedades sistema de ordenha mecanizada, em regimes de criação semiconfinados ou confinados, com animais de alto valor genético e com produção média de leite em 305 dias de lactação de 8.000 kg. Os associados tem a transação comercial de seus animais como fonte de renda. Alguns rebanhos da ACGHMG possuem inserção de alguns animais de outras raças como Girolando e Jersey. Os rebanhos foram classificados de acordo com a média aritmética da contagem de células somáticas nos últimos doze meses em cinco categorias conforme Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição da frequência em cinco categorias para a média aritmética da contagem de células somáticas de tanque rebanhos da ACGHMG.

Categoria MACCSTQ (x1.000 células/mL)	n (=67)	%	% acumulada
<250	10	14,9	14,9
251-400	22	32,8	47,7
401-600	21	31,3	79,1
601-750	6	9,0	88,1
751-1479	8	11,9	100,0

Legenda: MACCSTQ – média aritmética da contagem de células somáticas de tanque, n – número de rebanhos amostrados.

De acordo com Brito et al. (2002), aproximadamente 15% dos rebanhos da ACGHMG apresentaram adequado controle da mastite por apresentarem média anual inferior a 250.000 células/mL. Em contrapartida, aproximadamente 21% dos rebanhos apresentaram médias superiores ou igual a 600.000 células/mL, indicando sérios problemas relacionados a mastite. Em relação ao limite estabelecido na Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), aproximadamente 48% dos rebanhos apresentaram valor igual ou menor a 400.000 células/mL. A distribuição dos rebanhos classificados de acordo com as categorias de CCS indica que existe uma grande variação entre os rebanhos no que diz respeito à saúde da glândula

mamária, proporcionando redução da produção de leite que varia de irrelevante a 18% de acordo com trabalho de Brito et al. (2002).

Oitenta e cinco por cento dos rebanhos apresentam valores superiores a 250.000 células/mL, que representa uma das principais metas relativas a saúde da glândula mamária dos rebanhos (SCHUKKEN e KREMER, 1996) (Tabela 7). Dos rebanhos selecionados, 79% estariam adequados aos limites da Instrução Normativa 62 para CCS (BRASIL, 2011) para o período de julho de 2012 a junho de 2014. Quando foram aplicados estes resultados para os limites estabelecidos pela Instrução Normativa 62, a partir de julho de 2016, apenas 47,7% estariam atendendo aos valores previstos na legislação. Nos Estados Unidos, levantamento entre o período de 1995 a 2008 (USDA-APHIS, 2012), mostra a demora na redução dos níveis de CCS. No período de 13 anos foi observada redução de 5% de rebanhos com média anual de CCS acima de 400.000 células/mL para abaixo de 400.000 células/mL. Comparando os resultados de CCS dos rebanhos nos Estados Unidos ao longo do tempo e da ACGHMG, apesar de serem populações diferentes em termos de número de rebanhos, média de número de vacas por rebanho e nível de adoção de tecnologias das fazendas, mostra o tamanho do desafio que produtores terão pela frente para atender os limites de CCS estabelecidos na legislação.

Ações voltadas para o controle e/ou erradicação de patógenos responsáveis pelo aumento expressivo da CCS devem ser encarados como uma das diretrizes básicas para o controle da CCS nos rebanhos bovinos leiteiros. O conhecimento da prevalência dos patógenos envolvidos em cada rebanho permite traçar metas e ações diferentes para cada categoria de rebanhos classificados de acordo com a média anual da CCS, conforme apresentado na Tabela 7.

5.3 Relação entre CCS dos rebanhos e isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* do leite do tanque

Não foi verificada diferença entre as médias e medianas da CCS de acordo com os resultados de isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* em amostras de leite

do tanque (Tabela 8). O n pequeno utilizado para esta comparação pode ter sido o responsável por isso. A média da CCS de acordo com os resultados de isolamento dos patógenos foi de 430.000 células/mL, 447.000 células/mL e 600.000 células/mL, para rebanhos sem isolamento, com isolamento de apenas *S. aureus* e com isolamento de ambos patógenos, respectivamente. Não foi isolado um grupo com apenas a presença de *S. agalactiae*. Entretanto, ao se observar o desvio padrão destas médias, observa-se uma variação de 61 a 68% em relação à média. Apesar dos valores de CCS terem sofrido transformação de log na base 10 para realização da comparação entre médias, a natureza da variável estudada é instável, apresentando grandes variações em relação à média e dificultando a comparação entre rebanhos por meio de médias. A comparação das medianas de acordo com o resultado do isolamento, apesar de ser considerada uma análise não-paramétrica, não foi eficiente para detectar diferenças.

Tabela 8– Estatística descritiva da contagem de células somáticas (x1.000 células/mL) do leite de tanque de acordo com o isolamento da *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite do rebanho no período de 2011/2012.

Estatísticas	<u>Isolamento</u>		
	Sem isolamento	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> + <i>S. agalactiae</i>
Número de rebanhos	10	15	10
Média	430 ^a	447 ^a	600 ^a
Desvio padrão	292	235	366
1 IQ	300	213	399
Mediana	350 ^a	425 ^a	476 ^a
3 IQ	446	597	787
Mínimo	206	154	205
Máximo	1.237	875	1.479

1 IQ – primeiro intervalo interquartil; 3 IQ – terceiro intervalo interquartil; Letras iguais para médias e medianas entre colunas significa não diferença estatística (P>0,05)

Entretanto, através do qui-quadrado, quando comparamos os dados de prevalência encontramos uma associação explicada a seguir na Tabela 9. Não foi

observada associação entre a contagem de células somáticas do rebanho, considerado o limite de 400.000 células/mL, com o isolamento de *S. aureus*, mas, foi observada associação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre a CCS do rebanho, considerando o mesmo limite de 400.000 células/mL, com o isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae*. Os rebanhos com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* apresentaram em média 9,3 vezes mais chances da CCS do rebanho estar superior a 400.000 células/mL (Tabela 9).

Tabela 9– Frequência de rebanhos bovinos de acordo com a contagem de células somáticas e isolamento de *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite de tanque no período de 2011/2012.

Isolamento	F	CCS (x1.000)		P	RR	IC 95%
		<400	>400			
Sem isolamento	n	7	3	0,41	-	-
	%	50,0	27,3			
<i>S. aureus</i>	n	7	8	0,04	9,3	1,2 – 73,0
	%	50,0	72,7			
Sem isolamento	n	7	3	0,04	9,3	1,2 – 73,0
	%	77,8	27,3			
<i>S. aureus</i> + <i>S. agalactiae</i>	n	2	8	0,04	9,3	1,2 – 73,0
	%	22,2	72,7			

F – frequência; n – número de rebanhos; % - percentual de rebanhos; P – nível de significância exato para distribuição unicaudal; RR – risco relativo; IC - intervalo de confiança

Ressalta-se que o valor de 400.000 células/mL é o limite a ser atendido a partir de 2016 de acordo com a IN62 (BRASIL, 2011). Os dados mostram que esta variação de resultados foi principalmente devido à presença de *S. agalactiae* nos rebanhos. Entretanto, é importante ressaltar que a presença de animais infectados

por *S. aureus* e/ou *S. agalactiae* dentro do rebanho influencia significativamente na CCS (KEEFE, 2012; BRADLEY, 2002).

5.4 Análise espacial da contagem de células somáticas de rebanho

Apesar da área de análise espacial ter apresentado aproximadamente 300.000 km² e das grandes distâncias entre os rebanhos, foi observado dependência espacial para a CCS dos rebanhos. O semivariograma foi ajustado com o modelo exponencial e apresentou grau de dependência espacial e coeficiente de determinação moderados (GD=37,6; $r^2=0,31$) (ZIMBACK, 2001 e TRANGMAR et al., 1985), tendo como valores 50.000, 44.045 e 26.499 para os parâmetros a , C_0 e C_1 , respectivamente (Figura 3).

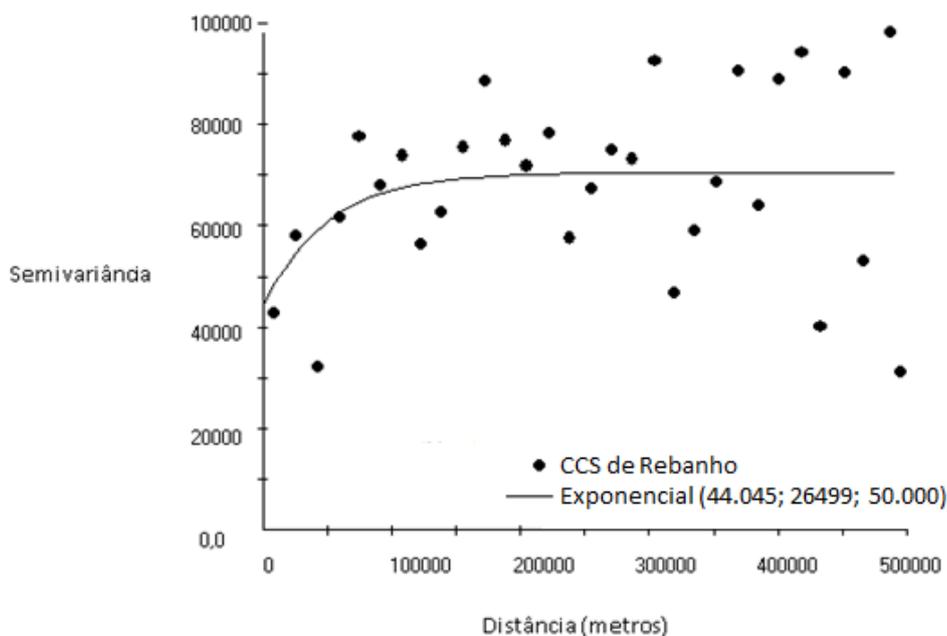


Figura 3 – Semivariograma com os parâmetros de ajuste exponencial para a contagem de células somáticas de rebanhos. Modelo (C_0 ; C_1 ; a).

Foi observado um patamar bem definido para o parâmetro relacionado ao alcance dentro da qual os rebanhos apresentaram-se correlacionados ($a=50.000$

metros). Desta forma, os rebanhos apresentam-se correlacionados no espaço em função da CCS até uma distância de 50 km de um rebanho para outro em linha reta. O parâmetro “C” mostra o valor do semivariograma correspondente ao seu alcance (a). A partir deste valor ou alcance (50.000 m), foi considerado que não existe mais dependência espacial entre os rebanhos, pois a variância da diferença entre pares de rebanhos tornou-se constante. O parâmetro C_0 , que representa o valor da semivariância para a distância zero, representou o componente de variabilidade espacial que não pode ser relacionado com uma causa específica, ou seja, variabilidade espacial ao acaso.

A dependência espacial da CCS em rebanhos foi observada em estudos realizados nos Estados de Rondônia e do Espírito Santo, com 270 e 860 rebanhos, respectivamente, utilizando-se a mesma metodologia (SOUZA et al., 2012; 2013). Entretanto, o número de rebanhos por unidade de área foi diferente entre os estudos, apesar do grau de dependência espacial (GDE) e o coeficiente de determinação (r^2) terem sido próximos em termos de valores e semelhantes, em termos de interpretação prática.

Ressalta-se que os sistemas de produção dos rebanhos de Rondônia foram caracterizados como extensivo, os de Espírito Santo como semi-intensivo e os da ACGHMG como intensivo. Desta forma, como os rebanhos apresentaram características comuns em termos de sistema de produção de acordo com os Estados, não foi possível associar dependência espacial da CCS em função dos sistemas de produção. Entretanto, sugere-se que independentemente do sistema de produção, a variação da CCS entre os rebanhos promoveu a dependência espacial encontrada.

Em função dos resultados da análise espacial, as regiões foram classificadas como de baixa (≤ 250.000 células/mL), média (251.000 a 600.000 células/mL) e alta (> 600.000 células/mL) (Figura 4).

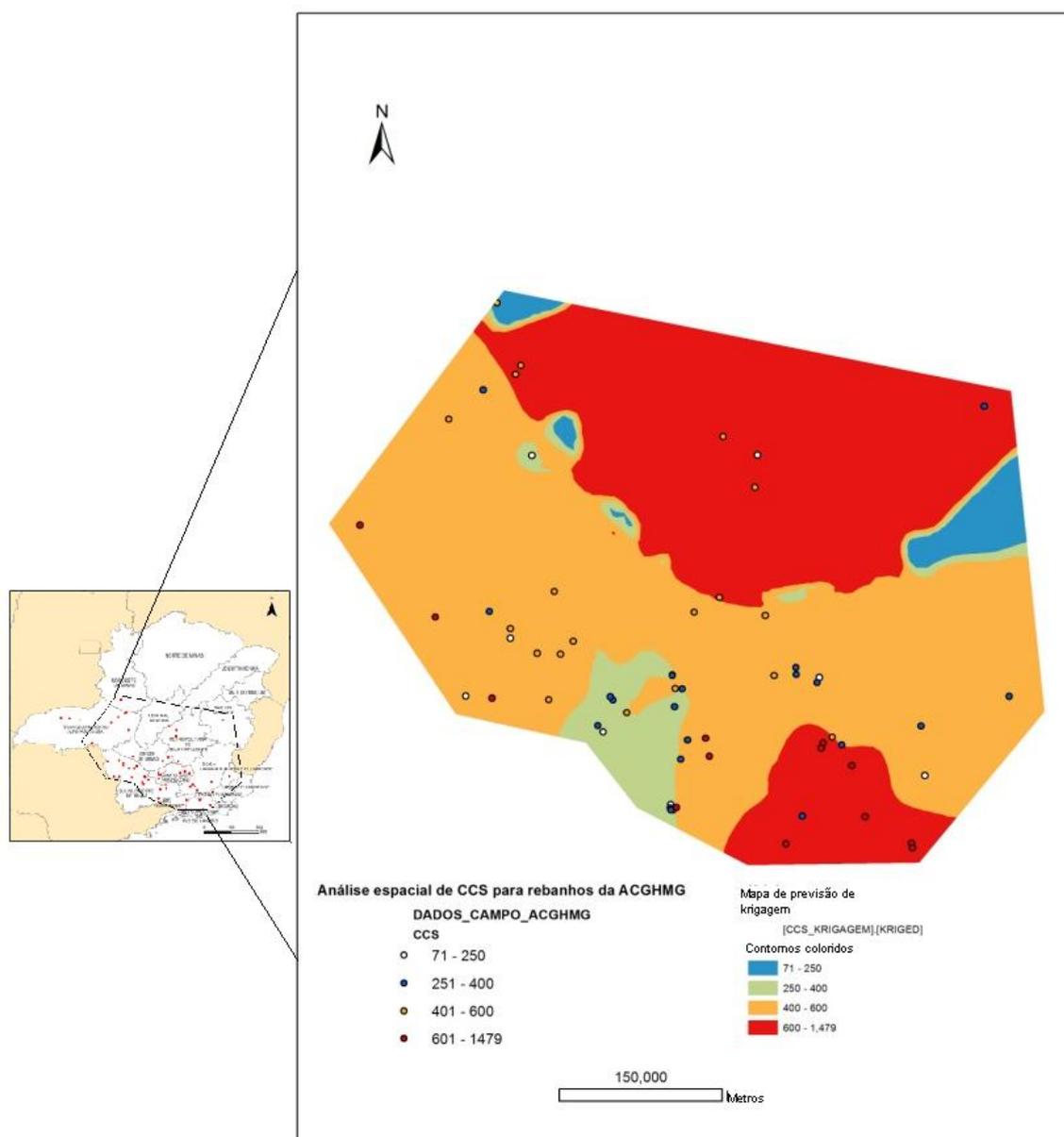


Figura 4 – Localização dos rebanhos da Associação dos Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais de acordo com a distribuição espacial da contagem de células somáticas de rebanhos estimados por krigagem

O número de rebanhos observados nas regiões de baixa, média e alta contagem de células somáticas foi 3, 74 e 35, respectivamente. No mapa, representado pelas cores laranja, azul e verde, as regiões centrais, ao leste e ao oeste da área estudada foram de baixa e média CCS. Regiões de alta CCS, representadas pela cor vermelha, se localizavam ao sul e ao norte da área

estudada. Ressalta-se que dentro das áreas de baixa CCS podem ser encontrados rebanhos com alta CCS e nas áreas de alta CCS rebanhos com baixa CCS. Os mapas indicam que a maioria dos rebanhos localizados em uma determinada área classificada em função da CCS apresenta valores correlatos para a CCS do leite do rebanho.

Outro resultado observado foi a identificação de áreas isoladas na mesma região de estudo e com o mesmo perfil de CCS. Por exemplo, foram identificadas duas áreas isoladas, não vizinhas, classificadas como de alta CCS, representadas pelas cores vermelhas (Figura 4). Para fins de estudo de prevalência, as regiões de baixa e média CCS foram agrupadas em uma categoria.

5.5 Relação entre prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* e contagem de células somáticas de acordo com as áreas de localização dos rebanhos

5.5.1 Prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*

A distribuição de frequência dos rebanhos, de acordo com as regiões do estudo, resultou em 42 rebanhos na Região 1 (ao norte) e 70 na Região 2 (ao sul). Respeitando a distribuição de acordo com as regiões, 40 rebanhos tiveram amostras do leite do rebanho (tanque de expansão) coletadas para isolamento e identificação de *S. aureus* e *S. agalactiae*, sendo 16 rebanhos para a Região 1 e 24 rebanhos para a Região 2, conforme apresentado na Tabela 10.

A prevalência aparente e a prevalência real para o *S. aureus* para a população estudada foi 70% e 93%, respectivamente. Os valores, prevalência aparente e prevalência real, foram 75% e 100% para a Região 1 e 67,0% e 89,0% para Região 2 (Tabela 10).

Tabela 10 – Prevalência aparente e prevalência real de *Staphylococcus aureus* em rebanhos da ACGHMG no ano de 2011-2012.

Região	Nº de rebanhos	<i>Staphylococcus aureus</i>			
		PA	IC 95%	PR	IC 95%
1	16	0,75 ^a	0,54 - 0,96	1,00	0,72 - 1,00
2	24	0,67 ^a	0,48 - 0,86	0,89	0,64 - 1,00
Geral	40	0,70	0,56 - 0,84	0,93	0,74 - 1,00

^aletras iguais entre linhas significa não haver diferença significativa - $p > 0,05$; PA – prevalência aparente; PR – prevalência real; IC – intervalo de confiança

Para o *S. agalactiae*, a prevalência aparente e a prevalência real foi 28,0% e 41,0%, respectivamente. Estes valores mostram o quanto a população do estudo está distantes de atingir um patamar razoável de controle de saúde da glândula mamária, se compararmos com os números de prevalência para *S. aureus* (43%) e *S. agalactiae* (2,6%) nos Estados Unidos, país que possui um programa de controle de patógenos contagiosos da mastite de longa data (USDA-APHIS, 2008). A prevalência aparente e prevalência real para o *S. agalactiae* foram 38% e 57% para a Região 1 e 21% e 31% para Região 2 (Tabela 11). Para ambos patógenos, os valores da prevalência aparente foram maiores na Região 1 em relação a Região 2, porém não foram diferentes estatisticamente ($P > 0,05$).

Tabela 11 – Prevalência aparente e prevalência real de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos da ACGHMG no ano de 2011-2012.

Região	Nº de rebanhos	<i>Streptococcus agalactiae</i>			
		PA	IC 95%	PR	IC 95%
1	16	0,38 ^a	0,14 - 0,62	0,57	0,21 - 0,93
2	24	0,21 ^a	0,05 - 0,37	0,31	0,07 - 0,56
Geral	40	0,28	0,14 - 0,41	0,41	0,20 - 0,62

^aletras iguais entre linhas significa não haver diferença significativa - $p > 0,05$; PA – prevalência aparente; PR – prevalência real; IC – intervalo de confiança

Em busca por um padrão de infecção da glândula mamária de rebanhos leiteiros em Minas Gerais, Brito et al. (1999) isolaram, de 6.315 amostras de quartos

mamários, 19,2% e 6,9% de *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente. Pesquisa da qualidade microbiológica do leite de tanques de região semelhante ao presente estudo observou a frequência de *S. aureus* e *S. agalactiae* em 92% e 50% dos rebanhos (ARCURI et al., 2006).

O método de diagnóstico usado para o isolamento dos patógenos, associados ao número de amostras usadas no presente estudo (apenas uma amostra por rebanho) para estimar a prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* nos rebanhos, pode classificar rebanhos como falsos positivos. De acordo com o *New York State Cattle Health Assurance Program*, EUA, a sensibilidade do teste de diagnóstico para cultura de uma única amostra de leite de tanque foi 75% e 90% para *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente (NYSCHAP, 2002). No Brasil, foi obtida uma sensibilidade de 75% e 66,7% para isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* a partir de uma amostra do leite do tanque (BRITO et al., 1998). Entretanto, no mesmo estudo, a especificidade de 100% foi observada para ambos patógenos. Desta forma, para se estimar a prevalência real, foram usados os valores da prevalência aparente, da sensibilidade e da especificidade do método diagnóstico para cada patógeno, como considerado em estudo de Brito et al. (1998).

Não foi observada diferença significativa entre as prevalências para *S. aureus* e *S. agalactiae* quando observamos os valores entre as Regiões 1 e 2 previamente determinadas (Tabela 10 e 11). Os resultados evidenciam que houve alta prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* na população de rebanhos estudada e uma distribuição homogênea destes patógenos entre os rebanhos de acordo com a Região 1 e 2.

Semelhante aos resultados de prevalência dos patógenos da mastite, não foi observada associação ($P > 0,05$) entre a CCS dos rebanhos de acordo com as Regiões 1 e 2 (Tabela 12). Os limites de CCS considerados nas análises foram 250.000, 400.000, 500.000, 600.000 e 750.000 células/mL, ou seja, limites que podem classificar os rebanhos desde sem problemas até muito ruim em termos de estimativa de distúrbios relacionado à saúde da glândula mamária (PHILPOT e NICKERSON, 1991; BRITO et al., 2002) e em função dos limites estabelecidos na Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011).

Considerando a classificação dos patógenos da mastite em função da intensidade do processo inflamatório, *S. aureus* e *S. agalactiae* são classificados como principais, pois proporcionam um aumento significativo da CCS de vacas individuais e, conseqüentemente, do rebanho (HARMON, 1994; SCHUKKEN et al., 2003; SOUZA et al., 2009). Desta forma, os resultados de prevalência do *S. aureus* e *S. agalactiae* e distribuição de frequência dos rebanhos em função da CCS de acordo com as regiões sugerem um padrão de distribuição homogênea dos patógenos e conseqüentemente da CCS entre as Regiões 1 e 2.

Tabela 12 – Distribuição de frequência entre os resultados da contagem de células somáticas de acordo com classificação da área de estudo em duas regiões de localização de 71 rebanhos da ACGHMG no período de 2011-2012.

CCS (x1000)	Região				P
	<u>1</u>		<u>2</u>		
	n	%	n	%	
<=250	3	13,6	7	14,3	1,000*
>250	19	86,4	42	85,7	
<=400	8	36,4	26	53,1	0,196
>400	14	63,6	23	46,9	
<=500	16	72,8	32	65,3	0,537
>500	6	27,2	17	34,7	
<=600	20	90,9	36	73,5	0,123*
>600	2	9,1	13	26,5	
<=750	21	95,5	41	83,7	0,257*
>750	1	4,5	8	16,3	

Região 1 – Triângulo Mineiro, Alto do Paranaíba e Metropolitana de BH; Região 2 – Sul de MG, Zona da Mata, Campos das Vertentes e RJ; n – número de rebanhos ; P – Nível de significância para o teste do Qui-quadrado; *Teste exato de Fischer

5.5.2 Prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* com base na análise espacial da contagem de células somáticas de rebanhos

O número de rebanhos, de acordo com áreas classificadas em função dos resultados da análise espacial da CCS dos rebanhos, ficou da seguinte forma: 77 rebanhos na Região de baixa e média CCS (< 600.000 células/mL) e 35 na Região de alta CCS (> 600.000 células/mL).

Os rebanhos selecionados para coleta de amostras de leite para realização de exames microbiológicos foram distribuídos em relação aos resultados da análise espacial da CCS, considerando as regiões de baixa e média CCS com 27 rebanhos e as regiões de alta CCS com 13 rebanhos (Tabela 13). Os valores da prevalência aparente e prevalência real para *S. aureus* foram 77,0% e 100,0%, respectivamente para a Região de Alta CCS e 67,0% e 89,0% para a Região de baixa e média CCS (Tabela 13). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores das prevalências de *S. aureus* entre os rebanhos classificados de acordo com a divisão da área em função da CCS. Os resultados mostram alta prevalência de *S. aureus* entre rebanhos, de acordo com as regiões, após análise espacial da CCS e com distribuição homogênea. Os resultados de prevalência antes e após a análise espacial da CCS dos rebanhos foram semelhantes, apresentando alta e homogênea distribuição da prevalência de *S. aureus* entre os rebanhos.

Tabela 13 – Prevalência aparente e prevalência real de *Staphylococcus aureus* em rebanhos da ACGHMG de acordo com a classificação da área em função da CCS dos rebanhos no ano de 2011-2012

Região (x 1.000 células/mL)	N	<i>Staphylococcus aureus</i>			
		PA	IC 95%	PR	IC 95%
Alta CCS (> 600)	13	0,77 ^a	0,54–1,00	1,00	>1,00*
Média e baixa CCS (< 600)	27	0,67 ^a	0,49 - 0,85	0,89	0,66 –1,00
Geral	40	0,70	0,56 - 0,84	0,93	0,74 - 1,00

^a letras iguais entre linhas significa não haver diferença significativa - $p > 0,05$; PA – prevalência aparente; PR – prevalência real; IC – intervalo de confiança; N – número de rebanhos

Trinta e dois por cento dos rebanhos amostrados para isolamento microbiológico e CCS apresentaram valores acima de 600.000 células/mL (Tabela 13). O percentual de rebanhos com alta CCS mostra a importância do controle dos patógenos contagiosos da mastite, já que rebanhos infectados com estes microrganismos apresentam maior CCS (HARMON, 1994; BRADLEY, 2002; SHUKKEN, 2003; SOUZA et al, 2009).

A prevalência aparente e prevalência real para o *S. agalactiae* dos rebanhos divididos de acordo com a classificação da área em função da CCS dos rebanhos estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Prevalência aparente e prevalência real de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos da ACGHMG de acordo com a classificação da área em função da CCS dos rebanhos no ano de 2011-2012

Região (x 1.000 células/mL)	n	<i>Streptococcus agalactiae</i>			
		PA	IC 95%	PR	IC 95%
Alta CCS (> 600)	13	0,62 ^a	0,36 – 0,88	0,93	0,53 - 1,00
Média e baixa CCS (< 600)	27	0,11 ^b	0,00 – 0,23	0,16	0,00 - 0,34
Geral	40	0,28	0,14 – 0,41	0,41	0,20 - 0,62

^{a,b} letras diferentes entre linhas significa haver diferença significativa - $P < 0,01$ ($p = 0,002$); PA – prevalência aparente; PR – prevalência real; IC – intervalo de confiança; n – número de rebanhos

Os valores da prevalência aparente e prevalência real para *S. agalactiae* foram 0,62 e 0,93 respectivamente para a Região de alta CCS e 0,11 e 0,16 para a Região de baixa e média CCS. (Tabela 14). Os valores de prevalência aparente e prevalência real para o *S. agalactiae* possuem diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos de rebanhos divididos de acordo com a classificação da área em função da CCS dos rebanhos. O Risco Relativo (RR) mostrou que rebanhos localizados na área de Alta CCS têm 5,5 vezes mais chances de apresentarem *S. agalactiae* ao isolamento.

A prevalência para *S. agalactiae* foi superior em rebanhos localizados em área de alta CCS (>600.000 células/mL), quando comparados com a prevalência de

rebanhos localizados em áreas de baixa e média CCS (<600.000 células/mL) (Tabela 14).

Rebanhos localizados na área de Alta CCS (>600.000 células/mL) têm 2,9 vezes mais chances de estarem acima de 500.000 células/mL, 9,2 vezes mais chances de estarem acima de 600.000 células/mL e até 33,3 vezes mais chances de estarem acima de 750.000 células/mL em relação aos rebanhos das demais áreas (Tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição de frequência e nível de significância do teste do qui-quadrado entre o percentual de rebanhos localizados nas áreas em função da contagem de células somáticas dos rebanhos da ACGHMG no período de 2011-2012

CCS (x1000)	Área				P	RR (IC 95%)
	Média e baixa CCS		Alta CCS			
	n	%	n	%		
<=250	8	15,7	2	10,0	0,714*	-
>250	43	84,3	18	90,0		
<=400	26	51,0	8	40,0	0,405	-
>400	25	49,0	12	60,0		
<=500	38	74,5	10	50,0	0,047	2,9 (1,1 – 8,6)
>500	13	25,5	10	50,0		
<=600	46	90,2	10	50,0	<0,001	9,2 (2,6 – 32,8)
>600	5	9,8	10	50,0		
<=750	50	98,0	12	60,0	<0,001	33,3 (3,8 – 292,6)
>750	1	2,0	8	40,0		

RR- risco relativo; IC 95% - intervalo de confiança de 95% para o risco relativo

O isolamento de *S. agalactiae* e *S. aureus* em grupos de alta CCS (>700.00 células/mL) foi da ordem de 41,5% e 18,3%, respectivamente, em trabalho conduzido por Erskine et al. (1988), superior ao achado em grupos de baixa CCS (>150.000 células/mL) onde não houve isolamento de *S. agalactiae* e apenas 2,2% das amostras foram positivas para *S. aureus*. A correlação encontrada entre a prevalência de *S. agalactiae* e rebanhos com alta CCS é justificada por

características deste patógeno que causa processo inflamatório intenso com grande liberação de células pela glândula mamária (KEEFE, 1997).

A adoção de medidas de controle, considerando aspectos epidemiológicos de cada patógeno contagioso e prevalência de vacas infectadas dentro de cada rebanho deve ser considerada com o objetivo de reduzir a taxa de novas infecções e duração de infecções (BARKEMA et al., 1998; BARKEMA et al., 1999; BRITO et al., 1999; RIEKERINK et al., 2006 e USDA, 2007a). A principal abordagem no controle e prevenção de *S. agalactiae* deve ser dirigida para a erradicação deste patógeno através do tratamento de vacas infectadas (KEEFE, 1997). Em contraste, a abordagem de medida de controle *S. aureus* deve basear-se no descarte de animais com infecção crônica devido a sua difícil eliminação (SOUZA, 2009). Os resultados do estudo mostram também a importância do diagnóstico de *S. aureus* e *S. agalactiae*, por meio de exames microbiológicos (individuais ou de tanque) na montagem da estratégia de redução da prevalência destes patógenos e consequentemente da CCS.

Estudos de prevalência de patógenos contagiosos da mastite, associados com a análise espacial da CCS de rebanhos, irão auxiliar na tomada de decisão, em nível de região, em programas de controle e prevenção da mastite.

Os resultados de prevalência indicam a necessidade de rever as medidas de prevenção e controle de *Staphylococcus aureus* e prevenção, controle e erradicação de *Streptococcus agalactiae* entre os rebanhos estudados.

6. CONCLUSÕES

Devem ser aprimoradas as estratégias de combate aos patógenos contagiosos da mastite junto aos rebanhos bovinos.

O isolamento de *S. agalactiae* nos rebanhos bovinos leiteiros é associado a alta CCS e a maior chance de não atender os limites estabelecidos na legislação.

A metodologia utilizada para análise espacial permite encontrar dependência espacial para CCS de rebanhos e identificar relação com a prevalência de *S. agalactiae*.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.A., MESQUITA, A.J., DIAS FILHO, F.C., JAYME, V.S. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do Estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção o leite. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Goiás, v. 28, n.1, p. 29-42, 1998.
- ARCURI, E.F.; BRITO M.A.V.P; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ANGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n. 3, p.440-446, 2006.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M. et al. Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk. **Journal Dairy Science**, v. 81, p.1917-1927, 1998.
- BARKEMA, H.W.; VAN DER PLOEG, J.D.; SCHUKKEN, Y.H. et al. Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. **Journal Dairy Science**, v.82, p.1655-1663, 1999.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HANCOCK, D. D.; HEIDER, L. E. Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1715-1721, 1992.
- BECK, H.S., WISE, W.S., DODD, F.H. Costs benefit analysis of bovine mastitis in the UK. **Journal of Dairy Research**, v.59, p.449-460, 1992.
- BERKE, O. Exploratory spatial relative risk mapping. **Preventive Veterinary Medicine**. 2005. 71, 173-182.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**. v. 164, n.2, p. 116-128, 2002.
- BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H. Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control – progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v. 51, n.3, p. 481-512, 1984.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 18/04/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 abr. 2002a. Seção I, p. 3.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002b. Seção I, p. 13-22.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 30 dez. 2011. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/arquivo/sislegis/anexos/arquivos/DO1_2011_12_30.pdf>. Acesso em: 30 fev. 2012.

_____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>> Acesso em: 30 fev. 2013

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

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

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural** vol.32 no.1 Santa Maria Feb. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000100014>. Acesso em: 15/06/2012.

BRITO, J. R. F., SOUZA, G. N., GOMES, C. G., MORAES, L. C. D. **Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 92**. Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007. 8 p.

CÂMARA, G.; MONTEIRO, A. M. V.; CARVALHO, M. S.; FUKS, S. D. **Análise espacial de dados geográficos**. São José dos Campos: INPE, 2004. 209 p. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro>>. Acesso em: 20 nov. 2012

CARVALHO M. S.; SOUZA-SANTOS, R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problema, perspectivas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 361-378, 2005.

COENTRÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; PAIVA E BRITO M. A. V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.283-288, 2008.

COPPOLA, M.M.; FENALTE, M.P.; DASSO, M.G.; CENCI, A. **Prevalência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite oriundas de pequenas propriedades leiteiras da região noroeste do rio grande do sul e sua suscetibilidade a antimicrobianos**. XIX Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal de Pelotas. 2010. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_00402.pdf> acesso em: 04/12/2012.

CORRÊA, A. B. A.; AMÉRICO, M. A.; OLIVEIRA I. C. M.; SILVA, L. G.; MATTOS, M. C.; FERREIRA, A. M. M.; COUCEIRO, J. N. S. S.; FRACALANZZA, S. E. L.; BENCHETRIT L. C. Virulence characteristics of genetically related isolates of group b Streptococci from bovines and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 429-433, 2010.

CRUPPE, L.H.; FOE, F.H.; FRANCO, F.; VASCONCELOS, C. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 47., 2008, New Orleans, Louisiana. **Anais...** Washington: National Mastitis Council, 2008. p. 218-219.

CRUZ, J.C.M.; MOLINA, L.R.; BRITO, J.R.F. et al. Eficiência da blitz terapia na erradicação de *Streptococcus agalactiae* e controle de *Staphylococcus aureus* em rebanhos bovinos leiteiros em: **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**, Passo Fundo: UPF, 2004. p. 136-140.

DEKKERS, J.C.M.; ERP, T.V.; SCHUKKEN, Y.H. Economics benefits of reducing somatic cell count under the milk quality program of Ontario. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.396-401, 1996.

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

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v.10, n.4, p.225-237, 1991.

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

ELY, L. O.; SMITH, J. W.; OLEGGINI, G. H. Regional Production Differences. **Journal of Dairy Science**, 86: (E. Supl.):E28–E34, 2003.

EPI-INFO 6.04b—**A word processing, database and statistics program for public health**. Center of Disease Control & Prevention (CDC). Geneva, Switzerland: World Health Organization, version 6.04b, 1997.

Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Hutchinson, L.J., Spencer, S.B., 1988. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 192, 766–768.

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

FAGUNDES, H., BARCHESI, L., NADER FILHO A., FERREIRA L.M., OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2010. 41: 376-380.

FERREIRO, L, SANTOS, E.C., SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.33, p.31-37, 1981.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

FRANKENA, K.; GRAAT, E.A.M. Multivariate analysis: logistic regression. In: NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C.M. et al. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. 1.ed. Wageningen: Wageningen Pers, 1997. p.135-178.

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

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

GODKIN M.A e LESLIE K.E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. **Canadian Veterinary Journal**. 1993;34:601–605.

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

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

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.

HARMON, R.J., EBERHART, R.J., JASPER, D.E., *et al.* **Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990.

JANSEN, J., LAM, T.J.G.M. The role of communication in improving udder health, **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Vol. 28, n. 2, July 2012, pages 363-379. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072012000205>> acesso em: 15/02/2013

KARIMURIBO, E. D.; FITZPATRICK, J. L.; BELL, C. E.; SWAI, E. S.; KAMBARAGE, D. M.; OGDEN, N.H; BRYANT, M.J; FRENCH, N. P. Clinical and subclinical mastitis in smallholder dairy farms in Tanzania: Risk, intervention and knowledge transfer. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 74. p. 84-98. 2006.

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

KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; SPANGLER, E. Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 3, p. 464-470, 1997.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Volume 28, Issue 2, July 2012. Pages 203-216. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072012000278>> acesso em: 15/02/2013

KEHRLI, Jr. M. E. K.; SHUSTER, D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 619-627, 1994.

KELTON DF, GODKIN MA. **Mastitis culture programs for dairy herds**. NMC Proc 39th Annual Meeting Nat Mastitis Council, 2000:54-62

KLEIN, C.H. e COSTA, E.A. Os erros de classificação e os resultados de estudos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, R.J. 3 (3): 236-249, jul/set, 1987

KOSSAIBATI, M.A.; ESSLEMONT, R.J. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.*, v.154, p.41-51, 1997.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LOPES JÚNIOR, J.E.F., LANGE, C.C., BRITO, M.A.V.P., SANTOS, F.R., SILVA, M.A.S., MORAES, L.C.D., & SOUZA, G.N. 2012. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, Apr. 2012.

MAGALHÃES, H.R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V.L.; PAZ, C.C.P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MENDONÇA, L.C., MOLINA, L.R., VENTURA, R.V., VIEIRA, R.F., DIAS, M.S., AMORIM M.A., GENTILINI, M.B. Associação de penicilina e novobiocina na erradicação de *Streptococcus agalactiae*. **Sociedade Brasileira de Zootecnia. Jaboticabal**. Anais: 2007. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/>> acessado em: 07/01/2013

MILK: Enumeration of somatic cells. Brussels: IDF, 1995. 8p. (IDF Standard 148A).

NATZKE, R.P. Elements of Mastitis Control. **Journal Dairy Science**, 64,1431-1442, 1981.

NYSCHAP - New York State Cattle Health Assurance Program. **Diagnosis of Mastitis and Diagnostic Methods for Investigating Udder Health Problems**. Disponível em: <<http://nyschap.vet.cornell.edu/module/mastitis/section2/Diagnostic%20methods.pdf>> Acesso em: 03/12/2012.

OLEGGINI, G.H., ELY, L.O., SMITH, J.W. Effect of region and herd size on dairy herd performance parameters. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1044-1050, 2001.

OLIVEIRA, E.F.; ABREU, L.R.; SILVA, M.R.; SOUZA, G.C.N. **Effect of herd's size and geographical location on somatic cell count of milk from Holstein cows (no prelo).**

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

OTT, S. L.; NOVAK, P. R. Association of herd productivity and bulk-tank somatic cell counts in US dairy herds in 1996. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 218, p. 1325-1329, 2001.

PERRY, B., MCDERMOTT, J., RANDOLPH, T., Can epidemiology and economics make a meaning full contribution to national animal-disease control? **Preventive Veterinary Medicine**, v.48, p.231-260, 2001.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis.** Naperville: Babson Bros. Co., 1991. 150 p.

PHILPOT, W.N. & NICKERSON, S.C. **Winning the fight against mastitis.** Naperville, IL: Westfalia-Surge, 2000. 188p.

PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., KRUIF, A., OPSOMER, G., PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n.1, p. 118-132, 2002.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Bacterial causes of bovine mastitis. In: **Veterinary Microbiology and Microbial disease.** Oxford: Blackwell, 2002. p. 465-475.

RIBEIRO, M.G., GERALDO, J.S., LANGONI, H., LARA, G.H.B., SIQUEIRA, A.K., SALERNO, T. e FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 29(1):52-58, janeiro 2009.

RIEKERINK, R.G.M., BARKEMA, H.W., VEENSTRA, S., POOLE, D.E., DINGWELL, R.T., KEEFE, G.P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk milk in Prince Edward Island. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, p.567-572, 2006.

SÁ, M.E.P.DE; CUNHA, M.L.R. DA; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importance of *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis: presence of enterotoxins, shock syndrome toxin and relationship with somatic cell count. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.320-326, 2004.

SALASIA, SIO, KHUSNAN, Z, LÄMMLER, C, ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal Veterinary Science** 2004;5:103–109.

SCHUKKEN, Y. H.; KREMER, D. J. Monitoring udder health: objectives, materials and methods. In: BRAND, A.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; SCHUKKEN, Y. H. **Herd health and production management in dairy practice**. Wageningen: Wageningen Pers, 1996. 351-426.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.579–596, 2003.

SCHUKKEN, Y.H.; LEEMPUT, E.S.D.; MORONI, P.; WELCOME, F.; GURJAR, A.; ZURAKOWSKI, M.; GUTIERREZ, C.; CEBALLOS, A.; ZADOKS, R. Contagious environmental – a herddiagnosis. In: **XXVII World BuiatricsCongress** 2012. Lisboa - Portugal, 2012, 145-148 p.

SIQUEIRA, K.B. e CANEIRO, A.V. **Principais Indicadores Leite e Derivados**: boletim eletrônico mensal. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 5, n.39, 13 fev. 2012. Disponível em:<http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2012_02_indicadores_leite.pdf>. Acesso em: 15/02/2013

SOUZA, G. N., BRITO, J. R. F., MOREIRA, E. C. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**, v.57, supl.2, p.251-260, 2005.

SOUZA, G.N., BRITO, J.R.F., MOREIRA, E.C., BRITO, M.A.V.P., SILVA, M.V.G.B. Fatores de risco para mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* em vacas leiteiras de rebanhos da região Sudeste do Brasil. In: 9 Congresso Panamericano do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...** 2006a. p. 249-253.

SOUZA, G.N., BRITO, J.R.F., MOREIRA, E.C., BRITO, M.A.V.P., SILVA, M.V.G.B. Fatores de risco para mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae* em vacas leiteiras de rebanhos da região Sudeste do Brasil. In: 9 Congresso Panamericano do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...**, 2006b. p. 255-259.

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

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

SOUZA, G.N., CARVALHO, G.L.O., GREGO, C.R., HOTT M.C., SILVA, M.R., BRUNO, A.F., OZÓRIO, R.S., HYLARIO, S.M., ENCARNAÇÃO, M.H. & OLIVEIRA, E.F. Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite. In: Encontro Nacional de Epidemiologia Veterinária, 1, 2012. Porto Alegre. **Resumos...**Porto Alegre: Acta Scientiae Veterinariae, 2012. 40(Supl 2): s78. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/40-suple-2/1%20ENEPI%20.pdf>> acesso em: 05/01/2013.

SOUZA,G.N.; GREGO, C. R.; HOTT, M. C.; SILVA, M. R.; CARVALHO, W.A.; HYLARIO, S. M.; AMARAL, C. M.; OLIVEIRA, E.F. Spatial analysis of bulk tank milk somatic cell counts from dairy herds located in Southeast Region of Brazil, 2011. In: 52 NMC Annual Meeting Proceedings, January 2013. San Diego. **Anais...**p. 207-208

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

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

USDA. Dairy 2007, **Part I: Reference of Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States**. Fort Collins, 2007a. 128 p. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_i_s_PartI_Highlights.pdf> Acesso em 02/04/2013.

USDA. Dairy 2007, **Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991-2007**. Fort Collins, 2007b. 92p. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_PartII_Highlights.pdf >. Acesso em: 10/02/2013.

USDA-APHIS. Prevalence of contagious mastitis pathogens on US dairy operations, 2007 **APHIS Veterinary Services Info Sheet**. n 533.1008. Fort Collins, CO: APHIS, USDA; 2008. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_ContMastitis.pdf > acesso em: 02/04/2013.

USDA-APHIS, Determining U.S. Milk Quality Using Bulk-tank Somatic Cell Counts, 2011. **APHIS Veterinary Services Info Sheet**. n 657.0812. Fort Collins, CO: APHIS, USDA; 2012. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy_monitoring/BTSCC_2011infosheet.pdf> acesso em: 05/04/2013.

VALLADARES, G. S.; AZEVEDO, E. C.; CAMARGO, O. A; GREGO, C. R; RASTOLDO, A. M. C. S. **Variabilidade espacial e disponibilidade de cobre e zinco em solos de vinhedos e adjacências**. *Bragantia*, Campinas, v.68, n.3, p.733-742, 2009.

VAUCLIN, M., VIEIRA, S.R., VAUCHAUD, G., NIELSEN, D. R. The use of cokriging with limited field soil observation. **Soil Science Society of America Journal.**, v.47, p.175-84, 1983.

VIEIRA, S.R.; MILLETE, J.A.; TOPP, G. C.; REYNOLDS, W. D. Handbook for Geostatistical analysis of variability in soil and meteorological parameters. In: ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo 2**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p 1-45.

VIEIRA, S.R. Geoestatística em estudos de variabilidade espacial do solo. In: Novais, R.F.; Alvarez, V.H.; Schaefer, G.R. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, v. 1, p. 1-54, 2000.

VILLANUEVA MR, TYLER JW, THURMOND MC. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *Journal American Veterinary Medicine Association*. 1991 Apr 15;198(8):1398-400.

WATTIAUX, M.A. **Lactation and milking – Mastitis: Prevention and detection**. Madison: Babcock Institute for International Dairy Research and Development / University of Wisconsin. p. 93-96. Disponível em: <<http://babcock.wisc.edu/node/120>> acessado em: 02/02/2013.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Alterações da composição e da produção de leite oriundo de quartos mamários de vacas com e sem mastite subclínica de acordo com o estágio e o número de lactações. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.4, p.419-426, 2005.

ZAFALON L.F., ARCARO J.R.P., NADER FILHO A., FERREIRA L.M., CASTELANI L. & BENVENUTTO F. 2008. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista Instituto Adolfo Lutz** 67(2):118-125.

ZIMBACK, C. R. L. **Análise especial de atributos químicos de solo para o mapeamento da fertilidade do solo**. 2001, 114f. Tese de livre docência – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP, 2001.