



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Dario Fernando Milanez de Mello

**Saúde e bem-estar de vacas leiteiras: ênfase em mastite e claudicação**

Florianópolis

2021

Dario Fernando Milanez de Mello

**Saúde e bem-estar de vacas leiteiras: ênfase em mastite e claudicação**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Agroecossistemas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho.

Coorientadoras: Profa. Shirley Kuhnen e Dra. Luciana A. Honorato.

Florianópolis

2021



Dario Fernando Milanez de Mello

**Saúde e bem-estar de vacas leiteiras: ênfase em mastite e claudicação**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho - Presidente

Profa. Dra. Vivian Fischer

Profa. Dra. Daniele C. S. Kazama

Profa. Dra. Maria José Hötzel

Prof. Dr. Luis Filipe Damé Schuch

Prof. Dra. Denise Pereira Leme (suplente)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Agroecossistemas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Orientador

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos que lutam pelo fim das injustiças  
e a construção de um mundo justo, solidário e igualitário.

## AGRADECIMENTOS

Com ela tudo começou: o primeiro afeto, o primeiro aprendizado. Com ela continuo aprendendo a amar e a lutar. Meu primeiro exemplo, de vida e de luta. Obrigado dona Lia Madalena.

À meu pai, o velho Chico, os primeiros passos e o exemplo do trabalho. A liberdade que proporcionou e aos valores que me ensinou. Saudade... de nossos olhares e da pouca, mas valorosa, conversa.

Às minhas irmãs, exemplos de mulheres, e às minhas sobrinhas e sobrinho.

À minha companheira Vanessa e ao Samuel, meus amores, pela paciência, carinho, compreensão e incentivo.

À meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho, pela confiança, atenção e orientação.

Às minhas coorientadoras Profa. Dra. Shirley Kuhnen e Dra. Luciana Aparecida Honorato pela disposição, paciência e auxílio dispensados.

Aos colegas, amigos e coautores, exemplos de estudo e dedicação, doutores Luciana Aparecida Honorato e José Alfredo Bran Agudelo, sem vocês este trabalho não seria concluído.

Aos professores e professoras do PGA que fazem deste programa de pós-graduação um farol que atrai muitos jovens em busca da ciência comprometida com as causas ecológica, econômica e social, qualificando-os para a produção de uma ciência responsável e dedicada a produzir conhecimento comprometido com as transformações necessárias a construção de um mundo justo e igualitário.

À secretária do PGA, Fabiana Dassoler, pela dedicação, carinho e paciência ao atender minhas demandas, muitas vezes fora de hora.

Aos colegas do PGA, aos bolsistas e integrantes do LETA e LABIMA que dedicaram seu tempo, acolheram e me incentivaram nas atividades de estudo e pesquisa.

Aos companheiros e companheiras das turmas especiais de medicina veterinária da UFPel, graduados, discentes, membros da coordenação e professores, fontes de motivação, inspiração e exemplos de dedicação e superação.

Aos companheiros e companheiras da COOPAN que nesta reta final me acolheram, mais uma vez. Pela confiança, inspiração e seus exemplos de vida, luta e organização do trabalho. Pelas palavras do camarada Bosa: *“Tchó, tu tens que te dedicar e concluir teu doutorado. Terminar o que começou porque o povo precisa de pessoas qualificadas...”*

Especialmente, ao responsável por haver chegado até aqui, camarada, professor, mestre e amigo, que nos deixou antes do tempo, vitimado pela Pandemia, Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado. Grato por ordenar insistentemente que eu fizesse o mestrado e agora o doutorado. É pelo senhor e para o senhor, para saldar minha eterna dívida de gratidão, pela amizade, pelos conselhos e orientações na vida, no trabalho, no estudo e, sobretudo, na luta por um mundo livre de opressão e injustiças que concluo esta etapa. Trabalhar a seu lado, vendo e vivendo seu exemplo ímpar de dedicação e disciplina bolchevique foi e será sempre um honor.

Finalmente, agradeço a todos agricultores e agricultoras que dedicam sua vida a produzir alimentos. Especialmente aos que colaboraram e dispuseram de seu tempo, instalações e animais para a realização dos estudos que fazem parte desta tese.

## RESUMO

Os objetivos da presente tese foram: I) avaliar a prevalência de mastite clínica e subclínica em diferentes sistemas produtivos e fatores de risco associados; II) identificar os principais agentes etiológicos de mastites subclínicas e seus níveis de resistência antimicrobiana nos diferentes sistemas produtivos e III) identificar índices de mastite e claudicação nos sistemas de estabulação permanente relacionando-os com teste de limiar nociceptivo térmico. Sendo assim, estruturou-se a apresentação dos resultados em três estudos. O primeiro descreve um estudo observacional de prevalência de mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros, em cinco sistemas produtivos: manejo agroecológico, baixo insumo, alto insumo e confinamentos *Freestall* e *Compost barn*; nos quais foram avaliados os fatores de risco individuais e de manejo associados à doença. O diagnóstico da mastite foi realizado durante acompanhamento de ordenha e foram obtidos dados produtivos, estruturais e de manejo de cada Unidade Produtiva (UP). Em nível de vaca, a paridade  $>3$  apresentou maior probabilidade de mastite subclínica. Dos fatores de rebanho, a ocorrência de mastite clínica assim como o acúmulo de sujeira na área pós-ordenha tiveram associação com maior prevalência de mastite subclínica. Os rebanhos confinados apresentaram maior prevalência de mastite que os rebanhos com acesso a pasto. No segundo estudo, avaliou-se as amostras de leite de vacas com mastite subclínica obtidas no primeiro estudo para os principais agentes da doença. Os principais agentes isolados foram *Streptococcus* spp. (n=54, 30,5%) e *Staphylococcus-coagulase* positivos (SCP) (n=54; 30,5%). A resistência a algum antimicrobiano ocorreu em 99,43% das amostras, sendo a Sulfametazina (80,2%) aquela que apresentou maior número de amostras resistentes dentre os demais: Gentamicina (29,37%), Penicilinas (29,37%), Oxacilinas (28,82%) e Ampicilinas (26%). A multirresistência (MDR) foi encontrada para todos os agentes etiológicos e em todos os sistemas produtivos (39,54%). Sistema de produção (p=0,26) e fazenda (p=0,24) não apresentaram efeito significativo sobre a porcentagem de resistência das amostras. O terceiro trata de um estudo realizado em dez granjas leiteiras que tinham sistemas de estabulação permanente, onde foram avaliadas 501 vacas em lactação. O diagnóstico de mastite foi realizado na pré-ordenha. Após a ordenha fez-se a aferição dos escores de claudicação enquanto as vacas permaneciam no estábulo de alimentação. O teste do limiar nociceptivo térmico (LNT) foi realizado sempre na região dorsal da falange média do membro anterior esquerdo. Os rebanhos apresentaram alta prevalência de mastite severa (25%) e claudicação clínica (54%). Dos animais com claudicação, 21% era severa (escores 4 e 5). Somente 30% das vacas não apresentam nenhuma dessas condições. As vacas apresentaram limiares térmicos



aumentados conforme o grau de severidade. A alta prevalência de processos dolorosos encontrada nesse estudo indica um comprometimento do bem-estar animal em sistemas de estabulação permanente. Em conjunto, os resultados dessa pesquisa demonstraram fatores de risco comuns aos diferentes sistemas produtivos, uma preocupante multirresistência bacteriana em todos os sistemas produtivos. Os sistemas confinados aqui estudados revelaram alta ocorrência de mastite e claudicação, o que é um risco ao bem-estar animal.

Palavras-chave: Mastite. Vacas leiteiras. Multirresistência. Limiar nociceptivo. Dor. Bem-estar animal

## ABSTRACT

Title: Health and welfare aspects of dairy cows in different production systems<sup>1</sup>

The objectives of this thesis were: I) to assess the prevalence of clinical and subclinical mastitis in different productive systems and associated risk factors; II) to identify the main etiologic agents of subclinical mastitis and their levels of antimicrobial resistance in the different productive systems and III) to identify mastitis and lameness indexes in the permanent housing systems, relating them to the thermal nociceptive threshold test. Thus, the presentation of results was structured in three different chapters (articles). Chapter I describes an observational study of the prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds, in five productive systems: agroecological management, low input, high input and Freestall and Compost barn feedlots; in which the individual risk and management factors associated with the disease were assessed. The diagnosis of mastitis was made during milking follow-up and productive, structural and management data were obtained from each Productive Unit (UP). At the cow level, parity > 3 was more likely to have subclinical mastitis. Of the environmental factors, the occurrence of clinical mastitis as well as the accumulation of dirt in the post-milking area were associated with a higher prevalence of subclinical mastitis. Confined herds had a higher prevalence of mastitis than those with access to pasture. In Chapter II, milk samples from cows with subclinical mastitis, obtained in the first study, were analyzed in the laboratory. The main isolated agents were *Streptococcus* spp. (n = 54, 30.5%) and positive *Staphylococcus* coagulase (SCP) (n = 54; 30.5%). Resistance to some antimicrobial occurred in 99.43% of the samples, with Sulfamethazine (80.2%) being the one with the highest number of resistant samples among the others: Gentamicin (29.37%), Penicillins (29.37%), Oxacillins (28.82%) and Ampicillins (26%). Multidrug resistance (MDR) was found for all etiological agents and in all productive systems (39.54%). Production system (p = 0.26) and farm (p = 0.24) had no significant effect on the percentage of resistance of the samples. In Chapter III, the study was carried out on the ten dairy farms selected for convenience that had permanent stall systems, where 501 lactating cows were evaluated. The diagnosis of mastitis was performed during pre-milking and after milking, the lameness scores were measured while the cows remained in the feeding stable. The thermal nociceptive threshold test (LNT) was performed using a device developed for this purpose. Herds had a high average prevalence of severe mastitis (25%) and clinical lameness (54%) of these 21% with severe lameness (scores 4 and 5) and only 30% of cows do not have any of these conditions. The cows showed increased thermal thresholds

according to the degree of severity. The high prevalence of painful processes found in this study indicates an impairment of animal welfare in permanent housing systems. Together, the results of this research demonstrated risk factors common to the different productive systems, a worrying bacterial multiresistance in all production systems. The confined systems studied here revealed a high occurrence of mastitis and claudication, which is a risk to animal welfare.

Keywords: Mastitis. Dairy cows. Multiresistance. Nociceptive threshold. Pain.

<sup>1</sup> Mello, DFM. 2021. Health and welfare aspects of dairy cows in different production systems. PhD thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de amostras resistentes para cada agente isolado nos diferentes sistemas avaliados. ....	67
Figura 2. Porcentagem de multirresistência <sup>a</sup> microbiana dos agentes isolados em cada sistema de produção.....	69
<sup>a</sup> Foi considerada multirresistente a apresentação de resistência à 3 ou mais classes de antibióticos (SCHWARZ, et al.,2010). ....	69
Figura 3. Demonstração da aplicação do aparato para verificação do limiar nociceptivo através de estímulo térmico. ....	78
Figura 4. Prevalência da mastite (CMT 3 e mastite clínica) em 501 vacas avaliadas, agrupadas por rebanhos alojados em <i>Freestall</i> (n=6) e <i>Compost barn</i> (n=4).....	82
Figura 5. Prevalência da claudicação severa (escores 4 e 5) em 501 vacas avaliadas agrupadas por rebanhos alojados em <i>Freestall</i> (n=6) e <i>Compost barn</i> (n=4).....	82
Figura 6. Variação do efeito aleatório por grupo (n=10) e por vaca observada (n=501). ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e categorias analisadas nos níveis de vaca e rebanhos.....	43
Tabela 2. Principais características das 62 UP's leiteiras visitadas no verão e inverno, para avaliar indicadores de saúde de úbere. ....	45
Tabela 3. Proporção de vacas e quartos mamários identificados com mastite clínica e subclínica e quartos mamários perdidos em 62 UP's leiteiras visitadas no verão e inverno. <sup>1</sup> .....	46
Tabela 4. Prevalência, nos rebanhos, de mastite clínica e subclínica e quartos mamários afuncionais em 62 UP's leiteiras com diferentes sistemas de manejo visitadas no verão e inverno.....	47
Tabela 5. Fatores associados com a ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras manejadas em rebanhos com acesso a pasto (n = 55) e confinados (n = 7) visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil. ....	48
Tabela 6. Fatores associados com a prevalência de mastite subclínica em rebanhos com acesso a pasto e confinados visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil.....	49
Tabela 7. Fatores associados com a prevalência de mastite subclínica em rebanhos com acesso a pasto e confinados visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil.....	49
Tabela 8. Principais agentes isolados de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica e % de resistência a antibióticos (N=177) de fazendas com diferentes tipos de manejos.....	64
Tabela 9. Descrição das Unidades de produção (n=10).....	80
Tabela 10. Proporção de vacas afetadas por mastite subclínica (CMT 1, 2 e 3), mastite severa (CMT 3 e MC), mastite clínica, claudicação clínica (escores 3, 4 e 5) e claudicação severa (escores 4 e 5) em 10 rebanhos alojados em <i>Compost Barn</i> (n=4) ou <i>Freestall</i> (n=6). ....	81
Tabela 11. Limiar térmico nociceptivo de vacas leiteiras, conforme sua condição em relação a mastite e claudicação. ....	81
Tabela 12. Distribuição das vacas avaliadas conforme o escore de claudicação (EC).. ..	83
Tabela 13. Prevalência média da mastite e claudicação severas conforme o tipo de alojamento. ....	83

Tabela 14. Modelo final: Limiar térmico nociceptivo de vacas leiteiras da raça Holandês (n=501), livres de mastite e claudicação (não afetadas), com claudicação severa e mastite moderada e severa, em 10 rebanhos. ....	85
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC- Antibióticos promotores de crescimento
- ARGs – Genes de resistência à antibióticos
- ATES – Assistência técnica e social
- CCS – Contagem de células somáticas
- CFL – Cefalotina
- CMT – *California Mastitis Test*
- DAS – Secretaria de Defesa Agropecuária
- DNIC – Controle inibitório nocivo difuso
- EC – Escore de claudicação
- FAO – Organização para Alimentação e Agricultura
- FDA – *Food and Drug Administration*
- HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical
- IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IC – Intervalo de confiança
- ICC – Coeficiente de correlação intraclasse
- ICr – Intervalo de credibilidade
- LA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associada aos rebanhos
- LABIMA – Laboratório Integrado de Bioquímica e Morfofisiologia Animal
- LETA – Laboratório de Etologia Aplicada e Bem-estar Animal
- LNT – Limiar nociceptivo térmico
- MDR – Multirresistência
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
- OIE – Organização Internacional de Epizootias
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OR – *Odds ratio*
- PAMVET - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em  
Alimentos de Origem Animal
- PNM – Penicilina+Neomicina
- RAM – Resistência Antimicrobiana
- RR – *Rate ratio*
- SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa
- SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

SIA – Analgesia induzida por estresse  
SIH – Hiperalgisia induzida por estresse  
SNA – Sistema nervoso autônomo  
SNC – Sistema nervoso central  
SUT – Sulfa+Trimetoprina  
TGH – Transferência gênica horizontal  
TGV – Transferência gênica vertical  
TVS – Terapia de vaca seca  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UP – Unidade de Produção



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
	2.1 EVOLUÇÃO DO CONHECIMENTO SOBRE MASTITE E FATORES DE RISCO	20
	2.2 O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	23
	2.3 COMO OCORRE A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA? .....	23
	2.4 A INTERFACE HUMANO-ANIMAL NA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	24
	2.5 MASTITE E CLAUDICAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS EM SISTEMA DE CONFINAMENTO.....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I - FATORES INDIVIDUAIS E DE MANEJO ASSOCIADOS COM MASTITE EM REBANHOS LEITEIROS EM SISTEMAS A PASTO E CONFINADOS.....</b>	<b>35</b>
	4.1 RESUMO .....	35
	4.2 INTRODUÇÃO .....	35
	4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
	4.3.1 <i>Avaliações baseadas no indivíduo</i> .....	39
	4.3.2 <i>Análise de dados: descrição, manejo de dados e modelos estatísticos</i> .	40
	4.3.3 <i>Avaliação de associações com mastite clínica, subclínica e quartos mamários afuncionais em nível individual</i> .....	41
	4.3.4 <i>Avaliação de associações com a prevalência de mastite subclínica em nível de rebanho</i> .....	42
	4.4 RESULTADOS.....	43
	4.4.1 <i>Descrição da amostra</i> .....	43
	4.4.2 <i>Associações em nível de indivíduo</i> .....	47

4.4.3	<i>Associações em nível de rebanho.....</i>	48
4.5	DISCUSSÃO.....	49
4.6	CONCLUSÃO .....	55
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO E SUSCETIBILIDADE</b>	
	<b>ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DE LEITE ISOLADAS DE DIFERENTES</b>	
	<b>SISTEMAS PRODUTIVOS.....</b>	<b>56</b>
5.1	RESUMO .....	56
5.2	INTRODUÇÃO .....	56
5.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
5.3.1	<i>Seleção das Unidades de Produção (UP) e amostragem de leite.....</i>	59
5.3.2	<i>Exames bacteriológicos .....</i>	61
5.3.3	<i>Teste de suscetibilidade a antimicrobianos .....</i>	61
5.3.4	<i>Análise estatística .....</i>	62
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.4.1	<i>Principais agentes identificados na mastite subclínica .....</i>	62
5.4.2	<i>Nível de resistência aos antimicrobianos .....</i>	64
5.4.3	<i>Resistência antimicrobiana nos diferentes sistemas de produção.....</i>	66
5.4.4	<i>Multirresistência antimicrobiana .....</i>	68
5.5	CONCLUSÃO .....	71
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO III - EFEITO DA MASTITE E CLAUDICAÇÃO NO</b>	
	<b>LIMIAR NOCICEPTIVO DE VACAS LEITEIRAS.....</b>	<b>72</b>
6.1	RESUMO .....	72
6.2	INTRODUÇÃO .....	72
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
6.3.1	<i>Procedimentos experimentais .....</i>	76
6.3.2	<i>Verificação da saúde do úbere e diagnóstico de mastite.....</i>	76
6.3.3	<i>Avaliação do escore de claudicação.....</i>	77
6.3.4	<i>Verificação do limiar térmico nociceptivo.....</i>	77
6.3.5	<i>Organização e análise dos dados .....</i>	78
6.4	RESULTADOS.....	79
6.4.1	<i>Descrição da amostra .....</i>	79
6.5	DISCUSSÃO.....	85
6.6	CONCLUSÕES.....	88

<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento e intensificação da atividade leiteira tem representado um desafio a saúde e bem-estar dos rebanhos leiteiros. A ocorrência de enfermidades pode comprometer o bem-estar e a longevidade dos animais, os índices produtivos, a qualidade do leite e, por fim, os resultados econômicos. Os sistemas de produção, por definirem a forma de vida dos animais e suas condições, podem se relacionar com eventuais quebras do equilíbrio instável do processo dinâmico da saúde e favorecerem o estabelecimento de enfermidades. O nível produtivo alcançado dentro de sistemas altamente intensificados faz com que a saúde e o bem-estar dos animais possam sofrer prejuízos e sejam comprometidos facilmente (BARKEMA et al., 2015). No Brasil os sistemas mais intensivos são relativamente recentes e em expansão, por isso há poucos estudos acerca de impactos destes sistemas sobre a saúde dos animais, em nosso meio e condições, o que motiva a realização deste trabalho.

Nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Etologia Aplicada e Bem-estar Animal – LETA/UFSC) desenvolve pesquisas há mais de 20 anos junto aos produtores de leite da Região Oeste de Santa Catarina e tem observado que, ao longo desse tempo, apesar de se manter a característica comum de utilização de mão-de-obra familiar, as unidades produtivas têm se diferenciado cada vez mais quanto à intensidade e manejo de produção. Nesse sentido, os pesquisadores têm descrito as seguintes tipologias nessa Região: de manejo agroecológico, de baixo insumo, de alto insumo e em estabulação permanente (que consistem em confinamentos do tipo *Freestall* e *Compost barn*). Alguns estudos já fizeram a caracterização desses grupos (BALCÃO et al., 2017), identificação de manejos que influenciam a produção, qualidade do leite (KUHLEN et al., 2015) e bem-estar animal (COSTA et al., 2013) em alguns desses grupos. Porém, ainda há uma lacuna de conhecimento sobre fatores de risco para ocorrência de mastite nesses grupos. O reconhecimento desses fatores é o primeiro passo para a formulação de recomendações que sejam adequadas às diferentes realidades.

Além disso, há poucos estudos no Brasil sobre resistência antimicrobiana em rebanhos leiteiros e desses, nenhum que tenha verificado a influência do sistema produtivo e as condutas de manejo adotadas em relação à resistência microbiana frente aos antibióticos. Um estudo dessa natureza é justificado pela tendência de vigilância e monitoramento global no uso de antimicrobianos. Nesse contexto mundial, os olhares se voltam para a China e o Brasil, primeiro

e segundo maiores consumidores de antimicrobianos veterinários no ano de 2017 (TISEO et al., 2020). Estima-se que haverá um aumento na cobrança de ações desses países para o enfrentamento da resistência aos antimicrobianos, que passará pelo controle desses produtos na agropecuária. Ações como a redução no uso preventivo, regulamentação sobre classes e quantidades de antimicrobianos usados em animais, abordagens alternativas aos antimicrobianos, dentre outras, devem ser precedidas de pesquisas básicas sobre o perfil de resistência nos diferentes sistemas produtivos.

Ainda, considerando a premissa de que os sistemas mais intensivos de produção leiteira impactam negativamente nas condições de saúde das vacas, é importante que essas condições sejam devidamente determinadas, não somente quanto ao perfil de morbidade de doenças, mas quanto à gravidade das mesmas. A gravidade de doenças como mastite e claudicação é acompanhada por processos dolorosos em diferentes graus. A imposição de limites ao sofrimento desses animais deve fazer parte da formulação de padrões mínimos de bem-estar animal, padrões esses subsidiados por investigações quanto à morbidade e severidade (entendida aqui como grau de sofrimento) dessas doenças. Também é possível que a identificação precoce e provimento de analgesia nos casos de mastite e claudicação reduzam a severidade e, por consequência, as condições de dor crônica vivenciadas por um número expressivo de vacas leiteiras em sistemas intensivos de produção.

Portanto, três questões de pesquisa foram abordadas nesse trabalho, pautadas pelas relações entre saúde e as práticas de manejo adotadas pelos diferentes sistemas: 1) há relação entre a ocorrência da mastite e o sistema de produção adotado? 2) há relação entre o perfil de resistência bacteriana e sistemas de produção leiteira? 3) como se comportam os animais acometidos pelas principais afecções em relação aos não acometidos, no que diz respeito a nocicepção? Cada uma dessas questões é abordada em um capítulo da tese, o que resultou em três artigos distintos. Uma revisão bibliográfica foi realizada inicialmente para apresentar o estado da arte e aprofundar alguns conceitos utilizados ao longo dos capítulos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EVOLUÇÃO DO CONHECIMENTO SOBRE MASTITE E FATORES DE RISCO

A mastite é a inflamação da glândula mamária e pode se apresentar de maneira clínica ou subclínica. Diferentes agentes etiológicos podem causar mastite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Alguns deles apresentam maior afinidade pela glândula e podem persistir no tecido por muito tempo sem gerar sinais evidentes ou produzindo infecções crônicas e possíveis episódios de mastite clínica. Outros agentes tendem a ser oportunistas e estão associados a infecções de curso agudo e severo.

Alterações na incidência e no padrão de mastite têm ocorrido nas últimas décadas, uma vez que a modernização da produção afeta os elementos clássicos da tríade epidemiológica Agente-Hospedeiro-Ambiente. Principalmente devido à adoção do “Plano de cinco pontos<sup>1</sup>” pelos produtores de leite dos EUA, nos últimos 40 anos, houve um grande progresso na redução da contagem de células somáticas do leite (RUEGG, 2017). Esse Plano foi amplamente adotado por vários países, tanto que no Reino Unido a incidência clínica de mastite diminuiu de 121 casos/100 vacas/ano em 1968 para entre 40 e 50 casos/100 vacas/ano em 2009 (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Contudo, a redução na incidência de mastite clínica foi acompanhada por mudanças na importância absoluta e relativa de diferentes patógenos (BRADLEY, 2002) e, a partir dos anos 70, os patógenos contagiosos (principalmente *Strep. agalactiae* e *Staph. aureus*) passaram a ter importância relativizada pelo surgimento de mastites causadas por patógenos oportunistas ambientais (RUEGG, 2017) e, desde então, agentes de mastite contagiosa e ambiental se alternam sob diversas condições (algumas ainda pouco conhecidas).

Mesmo que os agentes etiológicos se alternem em relação a sua importância e distribuição geográfica (RUEGG, 2017), há uma coincidência entre o aumento da intensificação e o aumento da prevalência de mastite. Ou seja, embora medidas de controle tenham reduzido a incidência até os anos 90, a partir do aumento da intensificação, a incidência que estava em torno de 13% passou para 25% em 2014 (USDA, 2014) nos rebanhos norte-americanos. No

---

<sup>1</sup> O Plano de 5 Pontos foi proposto pelo Conselho Nacional de Mastite, formado nos anos 60, que foi fundamental para controlar a mastite contagiosa e consiste em: (1) imersão eficaz das tetas pós-ordenha, (2) uso de terapia com antibióticos para vacas secas no final de cada lactação, (3) tratamento adequado de casos clínicos, (4) descarte de vacas cronicamente afetadas e (5) manutenção do equipamento de leite para garantir vácuo final estável do teto (RUEGG, 2017).

Brasil, a investigação mais recente indicou uma prevalência média da mastite subclínica estimada em 46,4% (n= 517 rebanhos), sem diferença entre tamanho de rebanho ou região estudada, o que reflete a falta de iniciativas para a melhoria na qualidade do leite (BUSANELLO et al., 2017).

Trabalhos de diferentes países e regiões apontam como agentes etiológicos da mastite mais prevalentes os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (BANGAR et al., 2014; BAŞTAN et al., 2008; LEVISON et al., 2016). Embora existam outros agentes envolvidos, estes dois gêneros são responsáveis por mais de 50% dos casos de mastite contagiosa, clínica ou subclínica.

No caso da mastite ambiental, as enterobactérias como a *Escherichia coli*, assumem posição de destaque (KALMUS et al., 2011; RASMUSSEN et al., 2011). Em que pese sua ocorrência estar associada a surtos episódicos, a severidade da mastite e os danos ocasionados pelas enterobactérias são maiores (SOARES et al., 2017). Do ponto de vista econômico a mastite subclínica causa maiores danos e prejuízos (GONÇALVES et al., 2018a). Atualmente a classificação binária em mastite contagiosa e ambiental vem sendo questionada. KLAAS e ZADOKS (2018), por exemplo, consideram essa classificação enganosa, já que vários patógenos classificados como contagiosos (*S. aureus* e várias espécies estreptocócicas) mantêm um ciclo de transmissão ambiental. Esses autores consideram que cerca de 90% das infecções são do tipo ambiental (*Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp).

Estudos recentes têm procurado entender quais as particularidades dos animais e características de manejo que predisõem os rebanhos a esses patógenos. Muitos fatores de risco estão associados às características individuais das vacas leiteiras. Em uma revisão sistemática, os fatores de risco mais importantes para a recorrência de mastite clínica foram paridade (ou seja, maior risco em vacas mais velhas), maior produção de leite, espécies de patógenos envolvidas no caso anterior e se uma cura bacteriológica foi observada após o caso anterior (JAMALI et al., 2018). Vacas de alta produção, devido ao metabolismo mais intenso, são mais acometidas por estresse oxidativo, que leva à inflamação da glândula mamária entre outras alterações metabólicas e reprodutivas (JÓŹWIK et al., 2012). Percebe-se que, em nível individual a mastite decorre dos desafios da vida produtiva dos animais, no entanto, muitos deles estão diretamente relacionados aos sistemas produtivos.

Os sistemas produtivos variam desde a criação dos animais em confinamento total até somente em pastagens e, ainda, nesse modelo, o manejo pode ser extensivo ou intensivo em piquetes ou em faixas, conforme revisado por MEE e BOYLE (2020). Portanto, os fatores de risco de doenças são associados aos tipos de sistemas e manejos adotados. Melhores condições

de bem-estar, de modo geral, tem sido associadas aos sistemas com maior acesso à pastagens (ARMBRECHT et al., 2019). No entanto, como os sistemas a base de pasto também podem ser intensivos e mistos, esse fator criação a base de pasto não é uma garantia, *per se*, de melhor saúde animal.

Os patógenos que predominam nos ambientes de confinamentos e de pastagens também são diferentes e, portanto, resultam padrões de prevalência de infecções diferentes. O patógeno causador de mastite mais identificado em novilhas durante o periparto em pastagens foi *S. uberis* (COMPTON et al., 2007) sendo frequentemente encontrado em condições pastoris, no solo, corredores e nos piquetes, infectando vacas principalmente no período seco (LOPEZ-BENAVIDES et al., 2007). Contudo, é possível que a infecção por esse agente reduza, por exclusão competitiva, infecções por outros patógenos ambientais como coliformes (COMPTON et al., 2007). Patógenos emergentes, como *Prototheca* e *Mycoplasma bovis*, em sistemas intensivos carecem de estudos sobre fatores de risco e estratégias de controle (RUEGG, 2017). Esses estudos demonstram como é dinâmica a relação entre patógenos e a necessidade de estudo dos nichos ambientais dos mesmos.

Em uma revisão sistemática, DUFOUR et al. (2011) encontraram associações pouco consistentes entre tipos de estabulação e contagem de células somáticas (CCS) e a maioria das práticas com associações consistentes, com menor CCS, foram relacionadas aos procedimentos de ordenha: uso de luvas durante a ordenha, uso de ordenhadeiras automáticas, uso de imersão da teta pós-ordenha, vacas problemáticas ordenhadas por último, inspeção anual do sistema de ordenha e uso de alguma técnica para manter as vacas em pé após a ordenha. De modo geral, alojamentos e manejos que reduzam a exposição direta das vacas a patógenos ambientais devem resultar em menos casos de mastite ambiental (KRISTULA et al., 2008). Então, a remoção frequente de fezes, remoção de águas paradas em corredores e áreas de descanso e evitar a superlotação de animais em galpões e em pastagens, são elementos-chave na redução desses casos (HOGAN; SMITH, 2012).

Atualmente o controle recomendado, principalmente da mastite ambiental, é dependente do uso de antimicrobianos, e não deve ficar restrito a eles (BRADLEY, 2002; KLAAS; ZADOKS, 2018; RUEGG, 2017). Para se reduzir o uso de antimicrobianos é preciso que os manejos sejam direcionados e baseados em estratégias de prevenção da ocorrência e, nos casos do uso racional desses medicamentos.

Um programa de saúde de úbere deve considerar o controle de fatores de risco ambientais, a capacitação dos agricultores, o manejo da ordenha, e dos animais e o monitoramento dos casos (PINZÓN-SÁNCHEZ; CABRERA; RUEGG, 2011). A prevalência



da mastite em um rebanho indica a magnitude da doença, que reflete as condições ambientais e de manejo deste rebanho. A prevalência de mastite subclínica inferior a 20%, ou a CCS inferior a 200.000/mL, indicam boas condições de ambiente e manejo (PETZER et al., 2017). Rebanhos com prevalência elevada de mastite tendem a maior uso de antimicrobianos e oferecem maior risco ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

## 2.2 O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Antimicrobianos são utilizados indiscriminadamente, sem controle ou recomendação adequada no mundo inteiro (DE JONG et al., 2018; TANGCHAROENSATHIEN; CHANVATIK; SOMMANUSTWEECHAI, 2018; THOMAS et al., 2015). Porém, estudos recentes indicam que esse problema é maior nos países de baixa e média renda (MAGNUSSON, 2020), locais considerados *hotspots* de resistência antimicrobiana (RAM) para os quais devem ser direcionadas maiores intervenções. Van Boeckel et al. (2019) projetam que haverá aumento de 67% até 2030 no consumo de antimicrobianos e quase dobrará em locais como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul. O Brasil figura atualmente em terceiro lugar, atrás somente da China e EUA, entre os maiores usuários de antimicrobianos na produção animal, notavelmente por ter o maior rebanho do mundo (VAN BOECKEL et al., 2019).

A resistência antimicrobiana, não se trata de um tema novo. Praticamente surge com a própria descoberta dos antimicrobianos. No entanto, sua evolução, coloca sob suspeita a capacidade da ciência em solucionar problemas de saúde no escopo do atual paradigma hegemônico da agricultura. Discutir os sistemas de produção e a ocorrência de enfermidades parece ser mais relevante, se o objetivo for mitigar a ocorrência e os efeitos destas sobre a saúde de maneira geral. O uso indiscriminado associado às más recomendações pode produzir a formação acelerada de resistência microbiana às drogas, o que está indicado em diversos trabalhos (DE JONG et al., 2018; LINDEMAN et al., 2013; MENDONÇA et al., 2012).

### 2.2.1 Como ocorre a resistência antimicrobiana?

SCHWARZ et al. (2010) alertam para o uso inadequado dos termos “resistência e multirresistência”, que se referem exclusivamente às propriedades de resistência adquiridas. As bactérias podem exibir resistência intrínseca (primária) a certos agentes antimicrobianos. A resistência intrínseca pode basear-se na falta ou na inacessibilidade do local alvo antimicrobiano entre as bactérias em questão. Em outros casos, bactérias intrinsecamente resistentes produzem

enzimas inativadoras. Tais resistências intrínsecas devem ser excluídas quando se descreve padrões de multirresistência. Estes autores sugerem, portanto, cuidado no uso do termo multirresistência, e que o mesmo somente seja usado se as bactérias forem testadas fenotipicamente e resistentes a pelo menos três classes distintas de antibióticos, ou submetidas à análise molecular e identificadas geneticamente para três fatores de resistência.

Até a década de 1960, o único mecanismo de resistência conhecido era o de transferência vertical, portanto, as recomendações baseavam-se na crença de que a seleção de resistência em animais de fazenda era apenas um problema local e essa resistência desapareceria espontaneamente após a interrupção da administração do medicamento (LEES et al., 2020). Na transferência gênica vertical (TGV), durante a replicação, a bactéria pode transferir um gene de resistência contido em um plasmídeo de uma célula-mãe para a próxima geração (SANSEVERINO et al., 2019). Entretanto, estudos realizados nas décadas seguintes mostraram que essa estratégia de controle estava equivocada, já que se sabe atualmente que a transferência gênica horizontal (TGH) é a via mais comum de transmissão de resistência bacteriana (LEES et al., 2020). Por essa via, os genes de resistência podem ser adquiridos de outras cepas e espécies por meio de diferentes mecanismos, o principal deles sendo a conjugação, onde o DNA pode ser transferido por plasmídeos móveis e parece haver poucas barreiras que impedem o compartilhamento desse gene por uma infinidade de gêneros diferentes (MARSHALL; LEVY, 2011). Após a conjugação, uma maior disseminação ocorre pelo crescimento celular, ou seja, os mecanismos de TGV e TGH coexistem naturalmente. Outras formas de TGH são: transformação, transdução, agentes de transferência de genes e transposons. Conhecendo esses mecanismos, não surpreende que se dê atenção a uma pequena minoria de bactérias que causam doenças conhecidas. Contudo, essas são somente a ponta do *iceberg* e, totalmente despercebido ou desconhecido, se encontra uma vasta maioria de espécies comensais e ambientais constituindo um imenso reservatório de genes de resistência, levado a caminhos complexos de propagação entre animais e humanos (MARSHALL; LEVY, 2011).

### 2.3 A INTERFACE HUMANO-ANIMAL NA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Microrganismos coabitam o planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos, adaptando-se e evoluindo nas mais diversas condições. É natural que estes organismos desenvolvam estratégias de sobrevivência, se adaptem e desenvolvam mecanismos de defesa como todos os seres vivos.

No entanto, o uso inadequado das drogas antimicrobianas pode ocasionar o aceleramento da produção de resistência (SCHWARZ et al., 2010).

A primeira droga (penicilina) foi descoberta em 1928. No entanto, o início da sua utilização se deu praticamente uma década depois, após o início do emprego das sulfas, nos primórdios dos anos de 1930. A maioria das drogas utilizadas atualmente, foram desenvolvidas até o final da década de 1960 (DAVIES; DAVIES, 2010). Desde então, é escasso o desenvolvimento de novas moléculas, muito embora novos nomes comerciais sejam lançados com certa frequência (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; LAM; CRAWFORD, 2018).

Os primeiros relatos de resistência às drogas antimicrobianas são datados do final da década de 1940 (DAVIES; DAVIES, 2010). Considerando o recente uso de antimicrobianos (80-90 anos), em relação a perspectiva histórica de evolução dos microrganismos, os mecanismos de produção de resistência têm se desenvolvido rapidamente, apesar de estudos serem controversos e contraditórios em relação ao tema. A ecologia da resistência antimicrobiana é complexa, o que gera a dificuldade em se estabelecer formas eficientes de controle de sua disseminação. Além dos mecanismos naturais de resistência resultantes da evolução das bactérias no ambiente (genes de resistência), humanos, animais e, conseqüentemente, todo o ecossistema, estão expostos a antimicrobianos sintéticos, como já comentado, há mais de 80 anos. Tanto na medicina humana quanto na veterinária, a resistência bacteriana é encontrada nos patógenos-alvo e também nos não-alvo dos tratamentos, ou seja, para cada bactéria-alvo existem centenas de milhões de bactérias comensais que também são afetadas nesse processo (USDA, 2014).

Grandes reservatórios de resistência a antimicrobianos residuais ocorrem na água, solo, vida selvagem e muitos outros nichos ecológicos, conforme revisado por COLLIGNON; MCEWEN (2019), o que torna o problema de saúde pública global. O relatório da OMS (WHO, 2014) indica que a vigilância da resistência antibacteriana não é coordenada nem harmonizada entre os países e há muitas lacunas nas informações sobre bactérias de grande importância para a saúde pública. Enquanto nos países de renda alta há sistemas de vigilância estabelecidos de longa data e altos níveis de conhecimento técnico, nos países de renda média e baixa há uma maior variação no nível e na qualidade da vigilância (WHO, 2014). Portanto, as três Organizações, FAO, OIE e OMS, recomendam a abordagem “Uma Só Saúde<sup>2</sup>” (MATAR;

---

<sup>2</sup> O conceito *One Health* foi criado para projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa em que vários setores se comuniquem e trabalhem juntos para alcançar melhores resultados em saúde

ANDREMONT; BAZZI, 2020), que consiste em uma abordagem multifacetada para o enfrentamento desse problema. Dentre as medidas adotadas, a redução e o uso racional de antimicrobianos na produção animal são fundamentais.

Apesar da resistência de bactérias em rebanhos e a relação com o surgimento geral de resistência na população humana não estar totalmente elucidada (MAGNUSSON, 2020), recentemente, o consumo de água na margem de lago e o transporte de bactérias multirresistentes em bovinos foram associados ao transporte de bactérias multirresistentes em comunidades pastoris, na Uganda (IRAMIOT et al., 2020). A alta resistência a múltiplas drogas entre organismos isolados de humanos e animais sugere a possibilidade de transmissão de bactérias multirresistentes entre as espécies (IRAMIOT et al., 2020). A resistência aos antibióticos pode se espalhar entre animais e seres humanos, o problema reside na compreensão limitada da natureza da resistência aos antibióticos (SINGER et al., 2003). A produção científica a respeito de RAM relacionada à produção animal tem investigado principalmente patógenos entéricos zoonóticos (VAN BOECKEL et al., 2019) que são transmitidos geralmente na cadeia alimentar, considerados de maior importância em saúde pública, e que se pode demonstrar um caminho causal mais evidente entre o uso de antimicrobianos em animais e a resistência aos patógenos em humanos.

A evolução do conhecimento sobre resistência antimicrobiana e a interface humano-animal é muito recente. Em artigo publicado em 2003, (BECKER et al., 2017; PIROLO et al., 2019) argumentavam que a maior parte da resistência nas pessoas era gerada pelo uso de antibióticos nas próprias pessoas e usavam como exemplo infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* (MRSA), que era a forma mais problemática de infecção resistente encontrada na medicina humana e, até então, não tinha conexão com animais. Menos de duas décadas depois, várias pesquisas já descrevem esse evento interespécífico. A partir de então, MRSA tem sido amplamente estudada em todas as espécies. ROSSI et al., (2019) encontraram genes de MRSA em vacas com mastite persistente por até nove meses e essas cepas foram encontradas em outros rebanhos da mesma região, indicando sua transmissibilidade e expansão clonal. Esses autores concluem que animais com mastite subclínica são um reservatório importante e um tanto negligenciado para transmissão dentro e entre rebanhos, e podem portar genes de virulência e resistência a antibióticos que contribuem para a colonização persistente, dificultam o controle da mastite e podem causar riscos à saúde pública.

---

pública. As áreas de trabalho nas quais a abordagem de Saúde Única é particularmente relevante incluem a segurança alimentar, o controle de zoonoses e o combate à resistência aos antibióticos.

Uma análise histórica muito interessante foi feita por BEGEMANN et al. (2018) sobre como os países formulam e regulamentam o uso de antibióticos para animais de produção, tomando como exemplo o Reino Unido e Suécia dos anos 1950 à 1990. Segundo essa revisão, na década de 60 surgiu a preocupação com bactérias resistentes vindas de animais usados na alimentação e na época foi instituído um comitê científico para estudar o assunto no Reino Unido que publicou o Relatório Swann, em 1969. O referido relatório é considerado um marco histórico porque pela primeira vez foi recomendada a “precaução” no uso de antibióticos em animais. Porém, uma das recomendações foi a divisão em duas categorias: “antibióticos promotores de crescimento” (APC) e “uso terapêutico” e, dessa forma, o uso preventivo na alimentação acabou sendo considerado menos importante e visto como aditivo alimentar inofensivo, uma vez que se acreditava que as altas dosagens terapêuticas é que levavam a resistência microbiana e não as subdosagens dos aditivos (BEGEMANN et al., 2018). Para BEGEMANN et al., (2018), esse comitê científico foi usado politicamente pelo governo para minimizar os riscos para a saúde pública, permitindo o uso indiscriminado de APCs, continuado até o final da década de 1990.

A Suécia foi o primeiro país a proibir o uso de APCs na alimentação animal, em 1986 e a demonstrar que, desde então, bons resultados produtivos podem ser alcançados com foco em prevenção, mais do que em tratamento (WIERUP, 2001). Essa postura foi seguida pela União Européia em 2006 e EUA em 2017 (MAGNUSSON, 2020). No Brasil, desde 1998, muitos medicamentos foram proibidos de serem usados como promotores de crescimento, no entanto, até o momento não estão disponíveis publicamente no país, dados sobre o uso profilático e terapêutico de agentes antimicrobianos em fazendas, nem resultados de programas de vigilância relativos à resistência antimicrobiana associada a animais de produção de alimentos (RABELLO et al., 2020).

Entre os vários usos dos antibióticos, cursos prolongados e de baixa dosagem de antibióticos entre animais para alimentação criam pressões seletivas ideais para a propagação de cepas resistentes (MARSHALL; LEVY, 2011), portanto, é possível que nos sistemas de produção animal onde o uso seja mais racional se encontrem perfis de resistência bacteriana diferentes. Segundo SANTOS (2013) no Brasil, apesar da existência de estudos sobre suscetibilidade antimicrobiana de agentes causadores de mastite, ainda não foram avaliadas a associação entre as práticas relacionadas ao tratamento e a susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite, bem como os possíveis fatores de risco. Investigações preliminares indicam que há menor uso de antimicrobianos em rebanhos orgânicos do que em convencionais (HONORATO et al., 2014a; SATO et al., 2005). Também uma menor

prevalência de resistência a antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* foi encontrada em fazendas leiteira orgânicas do que em convencionais nos Estados Unidos (TIKOFISKY et al., 2003). Contudo, o mesmo não foi observado em fazendas na Suíça (ROESCH et al., 2007). É possível que esses achados resultem da marcada diferença em relação à regulamentação (seja para produção orgânica ou não), disponibilidade de mercado, distribuição e utilização de produtos veterinários em cada país.

No Brasil, apesar das restrições de uso de quimiossintéticos na produção orgânica, o controle é pouco regulamentado e sem exigência de supervisão veterinária de uso para fins terapêuticos na produção animal de forma geral. Independente do sistema de produção no país, não existe controle na venda e, entre as poucas restrições ao uso das drogas antimicrobianas, a econômica é a que se impõe. Isso, de certa forma, induz a um erro frequente da utilização destas drogas, especialmente, o uso abreviado. Entre os desvios de finalidade e a má utilização destas drogas, pode-se citar dois exemplos: (1) uso como “promotores de crescimento” em sub dosagem; (2) uso “preventivo”, em nível populacional na recomendação de tratamento da vaca seca. Na França, mesmo com a prescrição de antibióticos sendo feita somente por veterinários, POIZAT et al. (2017) encontraram uso indevido em todos os sistemas de produção e somente os orgânicos não faziam uso sistemático de terapia de vaca seca.

Dentre as recomendações de MAGNUSSON (2020), para uso racional de antibióticos em animais, destacamos: evitar o uso preventivo regular de antibióticos, usar antibióticos por prescrição de um profissional e, sempre que possível, selecionados por teste de sensibilidade.

#### 2.4 MASTITE E CLAUDICAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS EM SISTEMA DE CONFINAMENTO

Pesquisas sobre os modos atuais de intensificação da atividade leiteira demonstram efeitos negativos, segundo CLAY; GARNETT; LORIMER (2019), sobre quatro dimensões: (1) meio ambiente, (2) bem-estar animal, (3) bem-estar social e econômico, e (4) saúde humana; porém, os estudos geralmente enfatizam apenas um ou dois desses aspectos. Quanto ao bem-estar animal, devem-se considerar três aspectos: (1) a saúde e o funcionamento biológico; (2) os estados afetivos dos animais e (3) liberdade dos animais para realizar seus comportamentos naturais (FRASER, 2008). Na prática, entretanto, há uma tendência a enfatizar a ausência de doenças e lesões, o que é mais simples de se medir (CLAY; GARNETT; LORIMER, 2019) e tem forte impacto no bem-estar.

Vacas leiteiras alojadas em sistemas de confinamento correm um risco significativo de serem acometidas por doenças infecciosas que cursam com processos dolorosos. A claudicação é considerada “indicador iceberg” de bem-estar em vacas leiteiras (COLLINS et al., 2015), devido à potencialidade de causar dor. Estima-se que a prevalência mundial de claudicação em rebanhos leiteiros seja de aproximadamente 25%, com uma tendência de menor prevalência (16,5%) em sistemas de pastagem ou mistos e maior prevalência em confinamento (54,8%) (revisado por COOK et al., 2016; BRAN et al., 2019; HUND et al., 2019; THOMPSON et al., 2019). A mastite também causa situações de desconforto permanente (FITZPATRICK et al., 1998; LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012) e mesmo mastite subclínica moderada tende a diminuir o limiar nociceptivo térmico, indicativo de hiperalgesia (PETERS; SILVEIRA; FISCHER, 2015).

Contudo, a avaliação de dor em animais é muitas vezes dificultada por vários motivos, um deles é devido ao comportamento estóico de algumas espécies. O bovino esconde sinais de dor e esse comportamento instintivo faz com que a detecção e tratamento de condições dolorosas sejam feitas tardiamente (O'CALLAGHAN et al., 2003) e também leva os produtores e técnicos a subestimar a prevalência dessas condições em seus rebanhos (BRAN et al., 2018; O'LEARY et al., 2020). Esse tema será abordado no Capítulo III e nessa revisão aprofundaremos alguns conceitos como dor, nocicepção, hiperalgesia, hipoalgesia, alodinia, sensibilização central e periférica, para um melhor entendimento do assunto.

A definição revisada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “*uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante, àquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial*” (DESANTANA et al., 2020). Já a nocicepção é uma resposta do sistema nervoso autônomo (SNA) a um estímulo doloroso. Dessa forma, a nocicepção se refere à codificação neural de dano tecidual iminente ou real, enquanto a dor se refere à experiência subjetiva de dano real ou iminente (MISCHKOWSKI et al., 2019).

Os conceitos atuais de dor enfatizam que a percepção da dor não está necessariamente relacionada de forma linear à entrada nociva, mas é criticamente influenciada por variáveis psicológicas (WIECH; TRACEY, 2009). Portanto, emoções podem modular a dor. Os conceitos de dor e emoções despertam muita discussão acerca da capacidade de percepções e níveis de consciência nas diferentes espécies. Tanto que, em 2012, esse tema foi amplamente debatido em uma conferência na Universidade de Cambridge, e um renomado grupo de especialistas redigiu um documento que é considerado um marco importante no reconhecimento de consciência em animais não humanos, o qual foi intitulado “Declaração de

Cambridge sobre Consciência”. A declaração resume que “a ausência de um neocórtex não parece impedir que um organismo experimente estados afetivos. Evidências convergentes indicam que os animais não humanos têm os substratos neuroanatômicos, neuroquímicos e neurofisiológicos de estados de consciência juntamente com a capacidade de exibir comportamentos intencionais. Consequentemente, o peso das evidências indica que os humanos não são os únicos a possuir os substratos neurológicos que geram a consciência. Animais não humanos, incluindo todos os mamíferos e as aves, e muitas outras criaturas, incluindo polvos, também possuem esses substratos neurológicos” (LOW et al., 2012). Portanto, os conceitos que utilizamos nesse trabalho, são sustentados por essa premissa.

Apesar da dificuldade de se avaliar estados subjetivos em qualquer espécie, a experiência emocional de animais não humanos pode ser avaliada ao longo de duas dimensões, em termos de valência (negativa ou positiva) e intensidade (de baixa à alta) (BACIADONNA et al., 2018). Estudos em humanos já demonstraram que emoções de valência negativa e de intensidade baixa a moderada facilitam a dor (hiperalgesia). No entanto, emoções com valência negativa, mas de alta intensidade inibem a dor (hipoalgesia) (para revisão ver RHUDY, 2016).

A hiperalgesia primária está relacionada a danos nos tecidos e inflamação reduzindo o limiar dos nociceptores, diz-se, portanto, que há uma sensibilização periférica. Já a hiperalgesia secundária é definida como um aumento da sensibilidade a estímulos nocivos para além do local da lesão do tecido e está relacionada com alterações no sistema nervoso central (SNC) e sensibilização central (WOOLF, 2011). Chamamos de alodinia quando há hipersensibilidade a estímulos não-dolorosos, também resultante da sensibilização central. A sensibilização central é definida operacionalmente como uma amplificação da sinalização neural dentro do SNC que elicia hipersensibilidade à dor, ou seja, ocorre um aumento prolongado, mas reversível, na excitabilidade e eficácia sináptica de neurônios das vias nociceptivas centrais (WOOLF, 2011). Portanto, a sensibilização central pode resultar em cronificação da dor (ASHMAWI; FREIRE, 2016), ou seja, a dor crônica não é simplesmente uma dor aguda que dura por mais tempo, mas sim um processo patológico com mecanismos diferentes.

Se a excitabilidade de neurônios nas vias de dor do SNC for aumentada, pode haver a ativação desses neurônios com estímulos inócuos de baixa intensidade. O resultado disso é uma maior capacidade de resposta (hiperalgesia e alodinia) a uma variedade de estímulos periféricos. Baseados nessas respostas foram desenvolvidos vários testes de limiar nociceptivos e os principais incluem estimulação mecânica, radiação por calor ou contato térmico (TADICH et al., 2013; MACHADO F; HURNIK; EWING, 1998; LOVE; MURREL; WHAY, 2011). Dessa forma, se for observada hiperalgesia mecânica, por exemplo, que ocorra fora da região



diretamente afetada, ou seja, em região secundária, é uma evidência de sensibilização central (MARTUCCI; YELLE; COGHILL, 2012). Inclusive já foi observada hiperalgesia em membro contralateral ao estímulo unilateral, mesmo que a área de sensibilização seja reduzida em comparação ao lado ipsilateral (SHENKER et al., 2008).

Em vacas leiteiras já foi demonstrado que a inflamação crônica dolorosa do casco leva a um aumento acentuado na concentração de citocinas no corno dorsal da medula espinhal, o que pode representar um estado de neuroinflamação do SNC (HERZBERG et al., 2020). Porém, o papel potencial dos opioides endógenos na transição entre a dor aguda e crônica tem sido recentemente objeto de debate. Enquanto no insulto nociceptivo agudo, os opioides endógenos atuam como o principal sistema antinociceptivo, durante os estados de dor crônica parece haver uma disfunção ou perda nas propriedades antinociceptivas desse sistema, onde a exposição crônica a opioides pode estimular a transmissão nociceptiva em níveis espinhais, conforme revisado por RODRIGUEZ et al. (2018). Portanto, há que se considerar que as dores por mastites e claudicações em bovinos podem ser agudas ou crônicas, de origem neuropática, inflamatória ou isquêmica, enfim, uma amplitude de condições que podem ter mediadores diferenciados, o que torna o estudo bastante complexo.

Por fim, é importante mencionar uma ferramenta de avaliação de dor, chamada de modulação condicionada da dor, onde se aplica um estímulo doloroso em uma área distante do corpo (= estímulo de condicionamento) e ocorre inibição a resposta à dor de outro estímulo nocivo (= estímulo de teste) (HERMANS et al., 2016). Esse fenômeno, também chamado de contrairritação da dor experimental em humanos, já foi demonstrado aplicando-se uma dor isquêmica no braço, por exemplo, eleva o limiar para dor por calor na testa (PERTOVAARA et al., 1982). Ou a inibição de uma dor de teste fásico (estímulo elétrico) por dor tônica (isquemia) simultânea, indica que essa inibição é provavelmente devido à ativação de um sistema endógeno específico de controle da dor (REINERT; TREEDE; BROMM, 2000).

Esse paradigma se assemelha ao mecanismo descendente de inibição da dor, mediado supra-espinhalmente, e ativado por um estímulo nociceptivo que, em modelos animais, é conhecido como controle inibitório nocivo difuso (DNIC). O DNIC pode ser desencadeado por qualquer tipo de estímulo de condicionamento - mecânico, térmico, químico ou elétrico - desde que esses estímulos sejam claramente nocivos, enquanto os estímulos não nocivos são completamente ineficazes (Revisado por DANZINGER; BARS; BOUHASSIRA, 2000). Nesse modelo, TANSLEY et al. (2019) observaram que camundongos submetidos à dor inflamatória tônica na cavidade abdominal (o estímulo de condicionamento) apresentaram hiperalgesia, não hipotalgesia, à estimulação térmica nociva (o estímulo de teste) aplicada à pata traseira. Esses

autores concluíram que, embora a magnitude da hiperalgesia fosse dependente da intensidade do estímulo de condicionamento, a direção do efeito depende da intensidade do estímulo de teste eficaz, com estímulos de menor intensidade levando à hiperalgesia e estímulos de maior intensidade levando à hipoalgesia (TANSLEY et al., 2019).

DANZINGER; BARS; BOUHASSIRA (2000) investigaram monoartrite aguda e poliartrite crônica em ratos e observaram que o DNIC desencadeado por estímulos nociceptivos das articulações inflamadas foi claramente exacerbado, paralelamente ao aumento da sensibilidade das articulações inflamadas a estímulos mecânicos. Em contraste, no estágio crônico de monoartrite, o DNIC desencadeado por estímulos térmicos ou de pressão foram quase semelhantes para tornozelos normais e inflamados. Esses autores sugerem que processos inflamatórios crônicos podem induzir uma reorganização da transmissão espinhal de sinais nociceptivos, o que modifica o recrutamento de DNIC. LOCKWOOD, BANNISTER e DICKENSON (2018) demonstraram que existem componentes noradrenérgicos e serotoninérgicos contribuindo para a expressão de DNIC. Em condição de osteoartrite, esses autores identificaram que na fase inicial da doença ratos têm um sistema DNIC funcional, esse mecanismo é abolido na fase tardia, indicando uma desregulação na modulação descendente ao longo do modelo. Em modelo semelhante, PEREIRA-SILVA et al. (2020) demonstraram que o DNIC, mesmo atenuado, continuou até os 42 dias na dor inflamatória articular crônica.

Em animais, ainda há o problema do contexto como possível interferente nos testes. MACLENNAN, JACKSON e MAIER (1980) verificaram que ratos submetidos a um choque elétrico, quando foram reexpostos ao contexto em que haviam recebido o choque, eram significativamente mais analgésicos - no teste de *hot plate* - do que os controles. Esse fenômeno é conhecido há mais de 30 anos como analgesia induzida por estresse (SIA), evento já demonstrado em diferentes espécies, como suínos (DANTZER; BLUTHÉ; TAZ, 1986), peixes (THOMSON et al., 2020) e até mesmo a exposição olfativa a machos, incluindo humanos, causou analgesia relacionada ao estresse em roedores (SORGE et al., 2014), situações que podem atuar com fator de confusão em experimentos. A analgesia induzida por estresse é mediada pela ativação da via inibitória descendente da dor (BUTLER; FINN, 2009). No entanto, esse mesmo mecanismo é responsável por produzir hiperalgesia induzida por estresse (SIH) (BAKER; MACHIN; SCHWEAN-LARDNER, 2019). De fato, existem atualmente vários modelos animais nos quais o estresse, seja agudo ou crônico, aumentam as respostas nociceptivas, estando envolvidos mecanismos como disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (eixo HPA) e de múltiplos sistemas neurotransmissores no SNC, incluindo

opioides endógenos, sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (IMBE; IWAI-LIAO; SENBA, 2006).

Toda essa revisão nos permite concluir que animais que apresentam dor resultante de mastite ou claudicação, poderiam responder a um teste nociceptivo tanto com hiperalgesia, se tiver ocorrido sensibilização central ou ter sido induzida por estresse (SIH), quanto responder com hipoalgesia/analgesia, explicadas pelos mecanismos DNIC ou SIA, a depender de uma série de fatores, como intensidade e cronicidade. Portanto, são necessárias mais investigações sobre esses fenômenos, principalmente quando os testes são realizados em ambientes de campo, como ocorre com animais de fazenda.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar aspectos de saúde em diferentes sistemas de produção que se relacionam ao bem-estar de vacas leiteiras, assim como, possíveis impactos sobre a saúde pública.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a prevalência e fatores individuais e de rebanho associados à mastite em diferentes sistemas produtivos.

- Identificar microrganismos e sua suscetibilidade a agentes antimicrobianos de isolados do leite de diferentes sistemas produtivos.

- Verificar o efeito da mastite e claudicação no limiar nociceptivo de vacas leiteiras.

## 4 CAPÍTULO I - FATORES INDIVIDUAIS E DE MANEJO ASSOCIADOS COM MASTITE EM REBANHOS LEITEIROS EM SISTEMAS A PASTO E CONFINADOS

### 4.1 RESUMO

Em um estudo observacional de prevalência de mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros, em cinco sistemas produtivos. Três deles a base de pasto: manejo agroecológico (n=18), baixo insumo (n=21), alto insumo (n=16). E dois em confinados: *Freestall* (n=4) e *Compost barn* (n=3). avaliamos os fatores de risco individuais e de manejo associados à doença. Em duas visitas realizadas no verão e inverno, foi realizado acompanhamento de ordenha e foram registrados dados produtivos, estruturais e de manejo de cada unidade produtiva (UP). Em nível de vaca, a paridade >3 e fase final de lactação foram associadas a maior probabilidade de mastite subclínica. Dos fatores ambientais, a ocorrência de mastite clínica, assim como o acúmulo de sujeira na área pós-ordenha, tiveram associação com maior prevalência de mastite subclínica. Os rebanhos confinados (sistemas *Freestall* e *Compost barn*) apresentaram maior prevalência de mastite que os rebanhos com acesso a pasto. Independentemente do nível tecnológico, todos os estabelecimentos estudados careciam de estratégias claras para o controle e monitoramento de mastite. Recomendações devem ser elaboradas conforme as características dos sistemas e a capacidade de implementação dos produtores e algumas delas são discutidas nesse estudo.

### 4.2 INTRODUÇÃO

A mastite é a doença de maior importância na produção leiteira do mundo. A contagem de células somáticas (CCS) é uma medida indireta do nível de mastite em um rebanho e é usada para avaliar a qualidade do leite (NICKERSON; OLIVER, 2014). O não cumprimento de práticas higiênico-sanitárias se reflete na baixa qualidade higiênica e microbiológica do leite, problema que ocorre na maioria das unidades de produção (UP's) leiteiras ao redor do mundo. Nos Estados Unidos é estimado que cerca de 80 a 90% das UP's estejam dentro dos limites de

CCS (NICKERSON; OLIVER, 2014). No Brasil esses números variam<sup>3</sup>, mas estudos recentes indicam que somente em torno de 30% dos produtores estão em conformidade (BALCÃO et al., 2017; CANDIOTTO et al., 2020).

A alta CCS é encontrada independente do sistema produtivo (CANDIOTTO et al., 2020; DEFANTE et al., 2019; KUHNEN et al., 2015). Contudo, há resultados controversos quando se compara os índices de mastite em diferentes sistemas. DEFANTE et al. (2019) identificaram que os sistemas que atendem aos padrões de qualidade possuem maior escala de produção e maior produtividade, o que, aliado a melhor conformidade confere maior poder de barganha desses produtores com a indústria. Resultado oposto foi encontrado por CASSOLI (2012), que identificou em fazendas maiores uma CCS 40% superior às fazendas menores. Estudos feitos nos EUA (FONTANELI et al., 2005; WASHBURN et al., 2002) e no Reino Unido (VANCE et al., 2012) indicam que vacas com acesso à pastagem tem menor incidência de mastite; em contraste, no Brasil foi observado um maior uso de antibióticos para tratamento de mastite clínica durante a estação chuvosa em comparação com a estação seca e esse efeito foi mais característico em rebanhos que alojavam vacas ao ar livre, ou seja, em piquetes (TOMAZI; DOS SANTOS, 2020). Esses resultados controversos demonstram a complexidade do tema e a necessidade de avaliações que procurem compreender os diversos fatores envolvidos.

Por ser uma doença multifatorial, o controle da mastite requer uma compreensão dos fatores de risco antes que intervenções possam ser definidas (MCDOUGALL et al., 2009). Apesar de vários fatores de risco já terem sido amplamente descritos na literatura desde os anos 60, os programas de controle de mastite são fracamente adotados pelos produtores de leite, ou seja, há uma grande lacuna entre o conhecimento dos fatores e a efetividade das intervenções. Entrevistas feitas com produtores de leite do Sul dos Estados Unidos mostram que aproximadamente 40% deles não seguem as práticas de manejo recomendadas para controlar a mastite em seus rebanhos (BALCÃO et al., 2017; NICKERSON; OLIVER, 2014). Então, é possível que recomendações muito genéricas sejam um dos motivos dessa pouca aderência. Porém, propostas individualizadas para cada fazenda são logisticamente inviáveis. A investigação de fatores de risco considerando-se diferentes sistemas produtivos pode gerar informações que embasem propostas mais aderentes à cada sistema.

No Brasil, os primeiros confinamentos instalados no país, com a concepção contemporânea, datam dos anos 80, entretanto, apenas recentemente estes sistemas começaram

---

<sup>3</sup> Alguns estudos utilizam como parâmetro a IN 51/2002, vigente até 2012, e outros utilizam a IN62/2012.

a se popularizar nas principais bacias produtoras de leite (MOTA et al., 2017). Portanto, ainda há poucos estudos acerca de possíveis impactos destes sistemas sobre a saúde dos animais, considerando as particularidades ambientais e estruturais, o que, por sua vez, também motiva a realização deste trabalho. Além disso, existe pouca informação sobre os fatores associados à mastite em diferentes sistemas de produção no sul do Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência e os fatores associados à mastite (mastite clínica e subclínica e quartos mamários afuncionais) em rebanhos leiteiros manejados confinados e à base de pasto no sul do Brasil. Para tanto, foi realizado um estudo transversal (também conhecido como *cross-sectional*), que consiste de uma pesquisa observacional analítica que é bem adequada quando o objetivo é investigar a prevalência<sup>4</sup> de doenças e avaliar as relações entre variáveis, gerando hipóteses de associações (ROTHMAN et al., 2008). Os resultados obtidos nesse estudo poderão ajudar a identificar recomendações para o controle e prevenção da mastite adequadas aos diferentes sistemas produtivos.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo transversal foi realizado entre 2016 e 2017 em rebanhos leiteiros distribuídos em 16 municípios do oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, com condições similares de solo e clima. Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Protocolo nº CEUA nº 7488201117) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Os objetivos, métodos e procedimentos específicos foram explicados a todos os agricultores participantes e seu consentimento foi obtido previamente à coleta dos dados.

A amostra foi selecionada por conveniência (DOHOO; WAYNE; STRYHN, 2003) e o relato do estudo está de acordo com a Declaração Veterinária STROBE para descrever estudos epidemiológicos observacionais (SARGEANT et al., 2016). Os produtores convidados a participar da pesquisa foram contatados por pessoas que realizam assistência técnica e social (ATES) na área de estudo. Os critérios de inclusão das UP's (Unidades de Produção) utilizadas no estudo foram os seguintes: a) enquadramento nos sistemas de produção estudados; b) disponibilidade e consentimento para participar do estudo; c) facilidade de acesso. Foram os técnicos locais que, baseados nesses critérios, selecionaram 83 UP's. Destas, 74 UP's foram

---

<sup>4</sup> Prevalência: é a proporção de uma determinada população que no momento do estudo apresenta uma doença, fator de risco e/ou outro tipo de problema.

visitadas durante o estudo, mas 11 foram visitadas apenas uma vez devido a problemas logísticos na realização das visitas, ou à indisponibilidade do agricultor para receber os pesquisadores. Uma fazenda foi excluída das análises, pois os dados foram influenciados por contingências no manejo durante as visitas. Ao final, 62 das 83 UP's inicialmente selecionadas foram visitadas duas vezes e foram consideradas nas análises.

As unidades de produção visitadas adotavam diferentes sistemas de manejo, à base de pasto ou confinado (Tabela 1). As seguintes tipologias de sistemas de manejo para produção de leite, adaptadas de BALCÃO et al. (2017) e KUHNEN et al. (2015), mais os sistemas confinados, foram considerados:

- a. Manejo à base de pasto com princípios agroecológicos (orgânicos e/ou em transição para certificação orgânica) simplesmente referidos como “agroecológico” (N=18): Estas UP's possuem pastagens manejadas sob o sistema de Pastoreio Racional Voisin (MACHADO, 2010). O manejo sanitário é restrito a utilização de produtos e insumos permitidos pela legislação de orgânicos (MAPA, 2003; 2011).
- b. Manejo à base de pasto com baixa utilização de insumos industriais, denominado “pasto baixo insumo” (N=21): Este sistema de manejo é considerado o mais antigo e tradicional na região, sendo no passado, o mais frequente. Em alguns casos são produtores sazonais, conforme a disponibilidade forrageira. Geralmente utilizam pastagens naturais permanentes, com pequenas áreas de pastagens artificiais e a quase ausência do uso de fertilizantes. Suplementam os animais esporadicamente em situações de escassez de pastagens. Possuem instalações simples em muitos casos adaptadas e aproveitadas de outras atividades.
- c. Manejo à base de pasto com alta utilização de insumos industriais, denominado “pasto alto insumo” (N=16): Os produtores deste sistema utilizam tecnologias dependentes de insumos industriais, como pastagens temporárias de elevada produtividade (pastagens anuais de inverno e de verão) e seguem recomendações técnicas convencionais do uso de fertilizantes de síntese química e agrotóxicos. Os animais são suplementados praticamente o ano inteiro com silagem e concentrado.
- d. Sistema de manejo em confinamento – tipo *freestall* (N=4): Neste sistema os animais são alojados em galpão com piso de alvenaria e camas individuais onde permanecem a totalidade do tempo, com exceção do momento da ordenha.
- e. Sistema de manejo em confinamento – tipo *compost barn* (N=3): Geralmente é separado em duas áreas, uma de alimentação e outra para o restante do tempo. O piso do galpão de confinamento é de terra e coberto com uma camada de serragem. Duas a três vezes



ao dia a cama é revolvida para auxiliar na remoção da umidade, redução do contato com excrementos e fermentação do material.

Nos três sistemas a base de pasto, todas UP's utilizam pelo menos divisão de parcelas com pastoreio rotacionado. Muitos tem introduzido árvores, especialmente os produtores do sistema agroecológico, para sombreamento e proporcionar melhor conforto térmico para as vacas.

#### **4.3.1 Avaliações baseadas no indivíduo**

As visitas nas UP's foram realizadas por um total de sete pesquisadores. Todos passaram por uma etapa de treinamento e padronização de procedimentos. Cada UP foi visitada duas vezes pelo mesmo pesquisador responsável pela realização dos procedimentos de coleta de dados.

As vacas lactantes foram identificadas individualmente no momento da ordenha e foram examinadas. O úbere foi inspecionado visualmente na sala de ordenha e foram realizados diagnósticos de mastite clínica e subclínica e contagem de quartos mamários não funcionais por indivíduo (BRITO et al., 1997; RADOSTITS et al., 1994).

A mastite clínica foi avaliada por sinais específicos de inflamação no úbere (edema, dor) e pela aparência (odor, cor, presença ou ausência de grumos, sangue ou material estranho) dos três primeiros jatos de leite. A mastite subclínica foi avaliada usando o reagente *California Mastitis Test* (CMT) onde as amostras que reagiram (formação de gel) foram consideradas positivas e classificadas, conforme a formação de gel em escores de 1 a 3. As amostras que não reagiram (CMT Negativo) foram consideradas negativas (RADOSTITS et al., 1994). Os resultados foram registrados em planilhas.

Informações sobre a produção de leite por animal e rebanho, paridade e fase da lactação por vaca foram coletadas dos registros ou relatadas por cada produtor, quando disponíveis. Do manejo de ordenha foram anotados: o tipo, material, condição de manutenção, condições de higiene da sala de espera, sala de ordenha e área de pós-ordenha e tipo de equipamento de ordenha. Foi registrado o local e momento da oferta e tipo de suplementação alimentar em horas próximas ao momento da ordenha.

Foi acompanhado o processo de cada ordenha e foram registradas as seguintes informações em relação ao manejo de ordenha: a) solução usada no pré-*dipping*, b) uso de pós-*dipping*, c) horário das ordenhas, d) produção por vaca e por dia (informado pelo ordenhador). Informações acerca do uso de antibióticos não foram obtidas porque a maioria dos produtores

não fazia anotações sobre tratamento, portanto, somente foi considerada a informação de uso ou não de terapia de vaca seca (TVS).

#### **4.3.2 Análise de dados: descrição, manejo de dados e modelos estatísticos**

Os dados foram conferidos para corrigir erros de digitação, porcentagem de dados perdidos, organizar tabelas e categorizar variáveis segundo a sua distribuição e significado biológico. A prevalência de mastite clínica e subclínica e de quartos mamários afuncionais foi estimada para cada visita e rebanho. A proporção de animais afetados por mastite clínica e subclínica e por quartos mamários afuncionais foi usada como desfecho nos modelos estatísticos em nível individual (animais afetados) e de rebanho (prevalência). Foi utilizada estatística descritiva, tabelas de frequências e gráficos de distribuição para analisar cada variável. Foram elaborados testes de correlação (Pearson ou Spearman, segundo o tipo de variável analisada) entre cada uma das variáveis na base de dados.

As seguintes observações foram censuradas nos três desfechos ao momento de elaborar os modelos: a) Vacas diagnosticadas com mastite em todos os quartos mamários foram censuradas para análises de mastite subclínica; b) Quartos mamários diagnosticados com mastite clínica foram censurados nas análises de mastite subclínica e vice-versa; c) Quartos mamários afuncionais foram censurados nas análises de mastite clínica e subclínica; d) Quartos mamários tratados com antibióticos ao momento da visita foram censurados; e) Dados sobre vacas primíparas até 9 dias após o parto e vacas múltiparas até 11 dias após o parto foram excluídos da análise (DOHOO et al., 2003). Para toda variável categórica foi calculada a proporção de animais afetados ou a prevalência por rebanho filtrando por cada desfecho.

Posteriormente foram avaliadas associações em nível individual e de rebanho. Para isso foram construídos modelos lineares generalizados multinível. Os dados perdidos em variáveis categóricas testadas nos modelos foram usados como um preditor adicional (categoria “dado perdido”).

Diagramas de causalidade foram construídos para selecionar as variáveis usadas nos modelos. Associações incondicionais entre pares de variáveis explicativas e entre estas e os desfechos foram avaliadas para detectar possíveis fatores de confusão ou variáveis intervenientes. Preditores associados ao desfecho na análise univariada ( $P < 0,2$ ) foram posteriormente testados em modelos de análise multivariada (DOHOO; WAYNE; STRYHN, 2003).

As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico R (R Core Team, 2020). Os modelos estatísticos foram ajustados usando o pacote lme4 (BATES et al., 2015). Os

modelos multivariáveis foram reduzidos usando a eliminação manual passo a passo, usando um valor de  $P \leq 0,05$  como o limite para manter os preditores no modelo. Uma variável foi considerada confundida se ao retirá-la do modelo multivariável os coeficientes para outras variáveis explicativas se modificaram ( $>10\%$ ) (VITTINGHOFF, 2005). O ajuste dos modelos foi verificado por meio de gráficos padrão de resíduos usando o pacote DHARMA (HARTIG, 2018). Os modelos se ajustaram aos dados.

### 4.3.3 Avaliação de associações com mastite clínica, subclínica e quartos mamários afuncionais em nível individual

Foram construídas regressões logísticas binárias multinível (Bernoulli) (KORNER-NIEVERGELT et al., 2015) para avaliar associações entre as variáveis explicativas para cada um dos desfechos (anexo script com análises univariáveis). O modelo final teve dois níveis e apresentou a seguinte forma:

$$Y_{ij} \sim \text{Bernoulli}(\text{probabilidade} = \pi_{ij}),$$

$$\text{Logit}(\pi_{1ij}/\pi_{0ij}) = \alpha + X_i \beta + v_j, \text{ onde } i = 1, \dots, n,$$

$$v_j \sim N(0, \sigma^2_\alpha),$$

$Y_{ij}$  é a ocorrência de mastite clínica e subclínica ou quartos mamários perdidos em um indivíduo “ $i$ ” aninhado no rebanho “ $j$ th”;  $\pi_{ij}$  é a probabilidade de ocorrência de cada um dos três desfechos e  $\alpha$  o intercepto da regressão. “ $X$ ” representa uma matriz com as variáveis explicativas oferecidas ao modelo e  $\beta$  são os coeficientes para cada variável.  $v_j$  é o efeito aleatório que reflete a variação residual entre vacas agrupadas por rebanhos. O rebanho foi considerado como efeito aleatório para controlar o efeito de medidas em vacas agrupadas dentro de cada unidade. As variáveis submetidas aos modelos univariáveis foram: a) Paridade das vacas (primeira, segunda, terceira ou maior, “dado perdido”); b) Terço de lactação das vacas (primeiro, segundo e terceiro); c) Litros de leite produzidos por vaca (informada pelos agricultores); d) Raça (Holandês, Jersey, Mestiças); e) Pesquisador (o diagnóstico de cada avaliador foi comparado com um veterinário usado como referente). Os valores  $P$  foram obtidos mediante teste Wald tipo II e os coeficientes foram transformados em *odds ratio* para apresentar os resultados.

#### 4.3.4 Avaliação de associações com a prevalência de mastite subclínica em nível de rebanho

Para a avaliação de fatores associados com mastite (clínica e subclínica) e quartos mamários perdidos no nível de rebanho foram usadas regressões Poisson multinível com a função *link* logaritmo natural. O modelo final teve dois níveis e apresentou a seguinte forma:

$$\begin{aligned}
 Y_{ij} &\sim \text{Poisson}(u_{ij} \theta_{ij}), \\
 &\log(u_{ij}), \\
 \theta_{ij} &= \exp(\alpha + X_{ij} \beta + v_j), \text{ onde } i = 1, \dots, n, \\
 v_j &\sim N(0, \sigma^2_\alpha),
 \end{aligned}$$

$Y_{ij}$  é a contagem de vacas afetadas por mastite clínica ou subclínica ou quartos mamários perdidos em um rebanho “ $i$ ”;  $\log(u_{ij})$  é a transformação logarítmica da contagem total de vacas lactantes por rebanho para cada visita (“*offset*”). A contagem total de animais lactantes avaliados por rebanho foi usada como “*offset*” para modelar a variável resposta como proporção de vacas afetadas em relação ao tamanho de rebanho (KORNER-NIEVERGELT et al., 2015). “ $X$ ” representa uma matriz com as variáveis explicativas submetidas ao modelo,  $\alpha$  o intercepto da regressão e  $\beta$  os coeficientes para cada variável.  $v_j$  é o efeito aleatório que reflete a variação residual por visita entre os rebanhos e foi incluído no modelo para controlar o efeito de medidas pseudorepetidas em cada unidade (visitas 1 e 2).

As variáveis submetidas aos modelos univariáveis estão descritas na Tabela 1.

Todas as variáveis associadas foram incluídas na modelagem estatística utilizando o sistema de manejo Pasto baixo insumo como referência. Os coeficientes foram obtidos mediante simulação do modelo final (2000 vezes) usando a função “*sim*” do pacote *arm* (GELMAN et al., 2018) e foi extraído o intervalo de credibilidade (95%) para os efeitos fixos dessas simulações. Os valores P foram obtidos mediante teste Wald tipo II. Os coeficientes foram transformados em *rate ratio* para apresentar os resultados. As interações entre todas as variáveis significativas foram testadas no modelo multivariável final.

Simulando os parâmetros do modelo (2000 x):

A função *sim* do pacote *arm* (GELMAN et al., 2018) foi usada para extrair valores aleatórios (2000x) da distribuição posterior conjunta do modelo (KORNER-NIEVERGELT et al., 2015). O intervalo de credibilidade (95%) para efeitos fixos foi extraído dos valores simulados.

Parâmetros simulados do modelo: a partir dos valores simulados, os quartis de 2,5% e 97,5% podem ser usados para o intervalo de credibilidade de 95% usando análise de dados Bayesianas com modelos lineares (KORNER-NIEVERGELT et al., 2015).

Tabela 1. Variáveis e categorias analisadas nos níveis de vaca e rebanhos.

Variáveis	Categorias
Mastite subclínica	Negativo; Positivo
Mastite clínica	Negativo; Positivo
Quartos mamários afuncionais	Negativo; Positivo
Raça	Holandês; Jersey; Mestiça
Paridade	Primeira; Segunda; Terceira ou maior; Dado perdido
Fase ou terço da lactação	Primeiro; Segundo; Terceiro
Produção de leite diária por vaca	Litros
Sistema de manejo	<i>Compost barn; Freestall;</i> Pasto agroecológico; Pasto alto insumo; Pasto baixo insumo
Limpeza do piso da sala de ordenha	Limpo; Sujo
Conservação do piso da sala de ordenha	Regular; Irregular
Presença de cocho na sala de ordenha	Sim; Não
Material do piso da sala de espera	Concreto; Terra
Tipo de piso da área de pós-ordenha	Concreto; Terra; Lodo; Pasto
Limpeza do piso da área de pós-ordenha	Limpo; Sujo
Oferta de alimento na sala de ordenha	Sim; Não
Solução pré-dipping utilizada*	Aquosa; Espuma
Diferença no intervalo entre ordenhas	0; 0>1h; 1h
Pesquisador	1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7

\* Solução aquosa=produto comercial aquoso ou hipoclorito de sódio; Espuma= produto comercial apresentado na forma de espuma.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Descrição da amostra

O número de vacas em ordenha na população de estudo variou de 2 a 82. Esta variável é uma característica que agrupa os sistemas de produção estudados, já que os confinamentos apresentam maior número de animais em ordenha e os sistemas à base de pasto possuem um número menor. Foram avaliadas 2.271 vacas em lactação nas duas visitas. A maioria das vacas examinadas (69%) era da raça Holandês e uma menor proporção Jersey (17%) ou mestiça (14%) (Tabela 2). Nos sistemas confinados a proporção de vacas da raça Holandês foi maior. A

produção de leite diária por vaca, informada pelos produtores variou entre 1 e 42 litros (Tabela 2), todavia, a maior parte de dados perdidos nessa variável estão concentrados nas UP's em sistemas de confinamento, então, é provável que isso faça a média de produção refletir os valores das vacas dos sistemas à base de pasto. Os produtores não tinham o hábito de registrar dados produtivos e nem as doenças dos animais ou seus tratamentos, bem como careciam de protocolos estruturados para o diagnóstico, tratamento e prevenção de mastite ou programas de promoção da saúde do úbere.

A alimentação dos rebanhos consistia em pastagens e suplementação com forragens ou concentrados em algumas épocas do ano nos sistemas à pasto baixo insumo e agroecológico. No sistema pasto alto insumo, além das pastagens, os rebanhos recebiam suplementação de silagem e concentrados, praticamente o ano inteiro. Nos sistemas confinados, a alimentação consistia em uma mescla de silagem, feno e concentrados. Nos sistemas a pasto baixo insumo e agroecológico os animais permaneciam nas pastagens com exceção dos horários de ordenha e suplementação alimentar. Nos rebanhos do sistema pasto alto insumo, geralmente as vacas ficavam entre às 11h e 16h no local onde recebiam suplementação, algumas vezes até a hora da ordenha. Nos sistemas confinados os animais permaneciam nos galpões o tempo integral. A reprodução dos rebanhos é feita com inseminação artificial ou monta natural durante o ano inteiro nos sistemas à base de pasto e nos sistemas de confinamento a inseminação artificial é realizada o ano inteiro.

Nas UPs com menor número de vacas em lactação (sistemas à base de pasto) a ordem de ordenha era determinada somente pela entrada dos animais na sala de ordenha. Nos sistemas confinados, havia a separação por lotes, cujo critério de formação era quase exclusivamente por produção (lotes de alta ou baixa produção).

Tabela 2. Principais características das 62 UP's leiteiras visitadas no verão e inverno, para avaliar indicadores de saúde de úbere.

<b>Categoria</b>	<b>Visita de verão</b>	<b>Visita de inverno</b>
Dados das visitas as UP's	Fevereiro (2016 ou 2017)	Junho ou Julho (2016)
<b>Vacas inspecionadas, n (%) – UP's</b>		
Total da população	1152 (100) – 62	1119 (100)
<i>Compost barn</i>	159 (13,8) – 3	159 (14,2)
<i>Freestall</i>	215 (18,7) – 4	229 (20,5)
Agroecológico	198 (17,2) – 18	217 (19,4)
Pasto alto insumo	321 (27,9) – 16	278 (24,8)
Pasto baixo insumo	259 (22,5) – 21	236 (21,1)
<b>Tamanho do rebanho em lactação<sup>1</sup></b>		
População total	18,6 ± 15,1 (2–78)	18,1 ± 15,8 (4–82)
<i>Compost barn</i>	53,0 ± 18,4 (40–74)	53,0 ± 25,9 (32–82)
<i>Freestall</i>	53,8 ± 17,1 (40–78)	57,2 ± 13,7 (47–76)
Agroecológico	11,0 ± 5,0 (2–21)	12,1 ± 4,7 (4–21)
Pasto alto insumo	17,8 ± 8,5 (8–37)	15,4 ± 7,9 (6–32)
Pasto baixo insumo	13,6 ± 6,0 (4–27)	12,4 ± 6,0 (6–28)
<b>Raça, vacas (%)</b>		
Holandês	795 (69,0)	764 (68,3)
Jersey	215 (18,7)	176 (15,7)
Cruza/Outras	142 (12,3)	177 (15,8)
Dados perdidos	0	2 (0,2)
<b>Paridade das vacas, (%)<sup>1</sup></b>		
População total	3,0 ± 1,8 (1–12), n = 918 vacas	3,2 ± 1,9 (1–11), n = 756 vacas
Primeira	201 (17,4)	161 (14,4)
Segunda	195 (16,9)	150 (13,4)
Terceira	262 (22,7)	161 (14,4)
Maior que terceira	259 (22,5)	291 (26,0)
Dados perdidos	235 (20,4)	356 (31,8)
Produção de leite diária (L) <sup>1, 2</sup>	16,8 ± 7,5 (1–40), n = 889 vacas	14,4 ± 6,6 (4–42), n = 703 vacas

<sup>1</sup> Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (Min–Max).

<sup>2</sup> A produção de leite foi relatada pelos agricultores durante a inspeção das vacas na sala de ordenha.

A mastite subclínica foi identificada em 12% dos quartos mamários e 32% das vacas na visita de verão, e em 12% dos quartos mamários e 30% das vacas na visita de inverno. Já a mastite clínica foi diagnosticada em 1% dos quartos mamários e 2,4% das vacas na visita de verão, e em 1% dos quartos mamários e 3,2% das vacas na visita de inverno. A prevalência de quartos mamários afuncionais foi de 1% na visita de verão, correspondendo a 4% das vacas e 1% na visita de inverno, correspondendo a 5% das vacas (Tabela 3).

Tabela 3. Proporção de vacas e quartos mamários identificados com mastite clínica e subclínica e quartos mamários perdidos em 62 UP's leiteiras visitadas no verão e inverno.<sup>1</sup>

Categoria <sup>2</sup>	Condição	Visita de verão (2016 ou 2017)				Visita de inverno (2016)			
		Quartos	%	Vacas	%	Quartos	%	Vacas	%
<b>Mastite subclínica</b>	Positivo	555	12,4	355	31,1	505	11,6	334	30,0
	Negativo	3930	87,6	785	68,9	3859	88,4	779	70,0
	Total	4608	–	1252		4476		1119	
	Censurado	123	–	12		112		6	
<b>Mastite clínica</b>	Positivo	51	1,3	28	2,4	53	1,4	36	3,2
	Negativo	3930	98,7	1119	97,6	3859	98,6	1082	96,8
	Total	4608	–	1152		3960		1119	
	Censurado	627	–	5		564		1	
<b>Quartos mamários afuncionais</b>	Positivo	52	1,1	50	4,3	55	1,2	53	4,7
	Negativo	4556	98,9	1102	95,7	4421	98,8	1066	95,3
	Total	4660	–	1152		4528		1119	
	Censurado	0	–	0		0		0	

<sup>1</sup> As UP's visitadas foram classificadas por sistema de manejo em: pastagem (agroecológica, n = 18; convencional baixo insumo, n = 21; convencional alto insumo, n = 16) e confinada (*freestall*, n = 4; *compost barn*, n = 3).

<sup>2</sup> Os quartos com mastite clínica foram censurados para as análises de mastite subclínica e vice-versa. Os indivíduos no início da lactação (até 11 dias após o parto), quartos secos e quartos mamários afuncionais foram censurados.

Em todos os desfechos houve ampla variabilidade na prevalência entre os rebanhos (Tabela 4).



Tabela 4. Prevalência, nos rebanhos, de mastite clínica e subclínica e quartos mamários afuncionais em 62 UP's leiteiras com diferentes sistemas de manejo visitadas no verão e inverno.

Categoria <sup>1</sup>	Visita de verão (2016 ou 2017)					Visita de inverno (2016)				
	Média	SD	Mediana	Min	Max	Média	SD	Mediana	Min	Max
<b>Mastite subclínica</b>										
Total	29,2	16,9	26,5	0	100	28,0	19,9	24,4	0	100
<i>Compost barn</i> (n=3)	39,9	9,7	41,7	29,5	48,6	43,8	32,2	40,7	13,3	77,4
<i>Freestall</i> (n=4)	38,7	15,9	37,4	20,8	59,2	40,6	13,2	39,8	25,4	57,5
Agroecológico (n=18)	29,4	23,4	25,0	0	100	27,3	19,0	25,0	0	72,7
Pasto alto insumo (n=16)	29,5	14,2	28,6	5,6	55,6	28,0	21,9	20,2	9,1	100
Pasto baixo insumo (n=21)	25,1	12,4	23,1	6,67	60,0	23,4	17,5	20	0	66,7
<b>Mastite clínica</b>										
Total	1,5	3,1	0	0	11,1	1,9	3,8	0	0	15,6
<i>Compost barn</i>	4,4	4,0	5,5	0	7,7	7,6	7,1	4,9	2,2	15,6
<i>Freestall</i>	5,0	2,1	4,9	2,5	7,6	7,3	5,9	8,0	0	13,2
Agroecológico	1,4	3,3	0	0	10	1,7	3,3	0	0	9,1
Pasto alto insumo	1,1	3,2	0	0	11,1	0,9	2,6	0	0	9,1
Pasto baixo insumo	1,0	2,4	0	0	7,7	0,9	2,7	0	0	9,1
<b>Quartos mamários afuncionais</b>										
Total	3,9	7,1	0	0	33,3	3,7	6,8	0	0	37,5
<i>Compost barn</i>	4,6	2,1	4,4	2,5	6,8	5,2	3,2	3,7	3,1	8,9
<i>Freestall</i>	5,8	1,7	5,9	3,9	7,6	8,4	1,8	8,2	6,4	10,6
Agroecológico	2,1	5,5	0	0	20	1,4	3,3	0	0	10
Pasto alto insumo	3,6	8,4	2,0	0	33,3	2,8	5,5	0	0	16,7
Pasto baixo insumo	5,4	8,3	0	0	25	5,6	10,1	0	0	37,5

<sup>1</sup>Os quartos com mastite clínica foram censurados para as análises de mastite subclínica e vice-versa. Os indivíduos no início da lactação (até 11 dias após o parto), quartos secos e quartos mamários afuncionais foram censurados.

#### 4.4.2 Associações em nível de indivíduo

Paridade foi associada a mastite em nível de indivíduo. Vacas em terceira ou maior número de partos apresentaram maior probabilidade de ocorrência de mastite (Tabela 5).

Tabela 5. Fatores associados com a ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras manejadas em rebanhos com acesso a pasto (n = 55) e confinados (n = 7) visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil.

Variáveis	Categoria	Visita verão			Visita inverno			
		OR	IC 95%	P-valor	OR	IC 95%	P-valor	
Paridade	Primeira (referente)	0,2	0,2-0,4	–	0,2	0,09-0,25	–	
	Segunda	1,1	0,6-1,7	0,842	1,4	0,7-2,7	0,314	
	Terceira ou maior	2,0	1,3-3,0	<0,01	2,9	1,7-5,0	<0,01	
	Dados perdidos <sup>5</sup>	3,0	1,7-5,3	<0,01	3,7	1,8-7,6	<0,01	
Efeito aleatório	Observações	Variância	Desvio padrão	ICC <sup>6</sup>	Observações	Variância	Desvio padrão	ICC <sup>6</sup>
62 rebanhos	1119 vacas	0,3	0,4	4,9%	1113 vacas	0,5	0,7	13,7%

<sup>1</sup> OR e IC 95% – *Odds ratio e intervalo de confiança de 95%*.

<sup>2</sup> Valores de P para cada variável foram computados através do teste de qui-quadrado de tipo Wald II.

<sup>3</sup> Visita de verão.

<sup>4</sup> Visita de inverno.

<sup>5</sup> Os dados perdidos estão concentrados nos sistemas de manejo *Freestall e Compost barn*.

<sup>6</sup> Coeficiente de correlação intraclasse (ICC%) foi computado usando a abordagem de variável latente.

#### 4.4.3 Associações em nível de rebanho

UP's com maior proporção de animais com mastite clínica, assim como, UP's com piso sujo na área pós-ordenha comparadas com as com piso limpo mostraram associação com mastite subclínica (Tabela 6).

A proporção de vacas afetadas por mastite subclínica foi superior em rebanhos confinados em comparação com rebanhos manejados em sistema à base de pasto. A proporção de vacas afetadas por mastite subclínica foi semelhante entre os sistemas manejados à base de pasto (Tabela 7). A terapia de vaca seca era realizada em todas as vacas em todos os rebanhos confinados enquanto nos rebanhos à base de pasto essa prática era realizada esporadicamente em vacas que apresentavam mastite clínica ou subclínica ao longo da lactação.

As interações entre todas as variáveis significativas foram testadas no modelo multivariável final e não encontramos significância.

Associações entre mastite subclínica e variáveis em nível de rebanho:

UP's com piso da área pós-ordenha sujo apresentaram maior proporção prevista de vacas afetadas por mastite subclínica (0,26 95% CrI 0,08 a 0,43) do que UP's com piso limpo.

Razão da taxa de incidência (coeficientes exponenciados): a proporção da taxa de mastite subclínica foi 1,3 (95% ICr 1,1 a 1,5) vezes maior em UP's com piso sujo na área pós-ordenha em comparação com UP's com piso limpo.

Tabela 6. Fatores associados com a prevalência de mastite subclínica em rebanhos com acesso a pasto e confinados visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil.

Variáveis	Categorias	RR <sup>1</sup>	ICr 95%	Valor P	
	Intercepto	0,2	0,2-0,3	–	–
Escore de limpeza da área pós-ordenha	Limpa	–	–	–	0,02
	Suja	0,3	0,1-0,4	0,01	
Vacas afetadas por mastite clínica no rebanho	Contagem	0,1	0,0-0,1	0,01	0,20
Efeito aleatório (Observações)	Variância	DP <sup>2</sup>	ICC <sup>3</sup>		
124 (62 rebanhos)	0,02	0,15			

<sup>1</sup> *Rate ratio* e Intervalo de credibilidade 95%

<sup>2</sup> Desvio padrão

<sup>3</sup> Coeficiente de Correlação Intraclasse computado usando a abordagem de variável latente.

Tabela 7. Fatores associados com a prevalência de mastite subclínica em rebanhos com acesso a pasto e confinados visitados em duas ocasiões no Sul do Brasil.

Variáveis	Categorias	RR <sup>1</sup>	ICr 95%	Valor P	
	Referente	–	–	–	0,05
Sistema de manejo	Pasto alto insumo				
	Confinado	1,8	1,5-2,3	<0,01	
	Pasto agroecológico	1,1	0,8-1,4	0,65	
	Pasto baixo insumo	0,9	0,7-1,1	0,39	
Efeito aleatório (Observações)	Variância	DP <sup>2</sup>	ICC <sup>3</sup>		
19 (6 Municípios)	0,03	0,16	0,017		

<sup>1</sup> *Rate ratio* e Intervalo de credibilidade 95%

<sup>2</sup> Desvio padrão

<sup>3</sup> Coeficiente de Correlação Intraclasse computado usando a abordagem de variável latente.

#### 4.5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi observada alta prevalência de mastite subclínica, em média de 30 a 32% nas duas visitas, o que é semelhante ao encontrado em estudos realizados anteriormente na região (COSTA et al., 2013). Esses resultados, entretanto, estão abaixo da média de 46%, encontrada no mais amplo estudo realizado no país (BUSANELLO et al., 2017). A prevalência de mastite clínica também esteve abaixo do encontrado em outras regiões (DA CUNHA et al., 2016; MARTINS et al., 2010). Porém, por ser uma doença que afeta enormemente o bem-estar dos animais, deve ser avaliada com atenção. A prevalência de quartos mamários afuncionais nos rebanhos foi 1% nas duas visitas correspondendo a 4 e 5% das vacas examinadas em cada

visita. Poucos estudos reportam esse desfecho que é, geralmente, uma consequência crônica da mastite. Tem sido reportadas prevalências de quartos mamários afuncionais de 2% a 6% dos quartos (SULEIMAN, KARIMURIBO; MDEGELA, 2018) em 18% das vacas em vacas a pasto (TOLOSA et al., 2015).

Dos fatores investigados, em nível de vaca, a paridade e em nível de rebanho, a ocorrência de mastite clínica e a higiene da área pós-ordenha tiveram associação com a prevalência de mastite subclínica nos rebanhos. Os rebanhos confinados apresentaram maior prevalência de mastite que os rebanhos com acesso a pasto. Portanto, essas associações serão discutidas mais detalhadamente.

Vacas com três ou mais lactações tiveram maior probabilidade de mastite subclínica do que vacas primíparas, o que foi reportado previamente (CARDOZO et al., 2015; TAPONEN et al., 2017). Isso ocorre porque o aumento do número de lactações implica em uma maior exposição à infecção (PANTOJA et al., 2020). Além disso, a profundidade do úbere muda com a idade das vacas, o que pode aumentar seu contato com patógenos presentes nas fezes (ROSSI et al., 2019). Animais com maior número de partos tendem a apresentar lesões mais permanentes na glândula mamária durante a lactação, resultando em infecções mais prolongadas (JAMALI et al., 2018). Ao aumentar a paridade das vacas, aumentam as perdas de leite provocadas pela mastite (GONÇALVES et al., 2018b) o que agrava a situação. Isso indica que o bem-estar das vacas empobrece na medida em que envelhecem e as cronicamente infectadas podem atuar como reservatórios e espalhar para outras vacas durante o processo de ordenha. Dessa forma, o abate de vacas cronicamente infectadas acaba sendo o meio mais prático (de fato é um dos pontos do “Programa de 5 Pontos” de controle de mastite), o que reduz o potencial de vida, outro elemento importante do bem-estar animal. Como afirma JONES (2009), no *Guidelines to Culling Cows with Mastitis*, “o controle da mastite não é alcançado por abate agressivo porque tal programa de controle não impede a propagação de novas infecções causadas por *S. aureus* e, em menor grau, *S. agalactiae* e *Mycoplasma*”.

A associação entre mastite clínica e subclínica encontrada nesse estudo corrobora com a estimativa que, em média, para cada caso clínico, existem 20 a 40 casos subclínicos (WATTIAUX, 2014). Esses dados reforçam que as recomendações preventivas de identificação de vacas acometidas e uso de barreira entre elas (*pré-dipping*), ainda são as melhores formas de controle. Inclusive, a realização de duplo *dipping* foi uma característica encontrada em fazendas que produzem leite de alta qualidade (HILLERTON; BOOTH, 2018; DURST, 2012), se mostrando uma técnica positiva no controle da mastite.

É interessante notar nesse estudo que, mesmo os confinamentos adotando amplamente a terapia da vaca seca (TVS), seus níveis de mastite subclínica foram maiores do que os produtores que não faziam o uso rotineiro. A TVS com antibióticos tem sido sugerida como uma das opções para controlar infecções intramamárias e prevenir o desenvolvimento de mastite, já que a maioria de casos novos ocorre nesse período (TIWARI et al., 2013). Além da vantagem da TVS não precisar descartar o leite dos quartos tratados, o sucesso no tratamento nesse período varia entre 50 e 100%, dependendo do agente (TIWARI et al., 2013). Porém, o uso preventivo de antimicrobianos tornou-se questionável e atualmente a TVS não é permitida na rotina em vários países (SCHERPENZEEL et al., 2016). Então, a recomendação dessa prática deve ser analisada conforme características dos rebanhos para uso seletivo. Fatores como a CCS em nível de vaca e/ou rebanho, paridade e mastite clínica devem ser considerados na decisão por TVS seletiva. Produtores orgânicos podem se beneficiar de uma combinação de critérios como CCS, histórico de mastite clínica, CMT na secagem e paridade, para implementar TVS seletiva (KIESNER et al., 2016). Essa estratégia pode levar a uma redução no uso de antimicrobianos de até 60%. Contudo, os critérios de CCS devem ser rigorosamente obedecidos para que não ocorra aumento na incidência de mastite clínica ao parto (SCHERPENZEEL et al., 2016). Devido a essas controvérsias, uma recente revisão sistemática e meta-análise foi realizada por WINDER et al. (2019) comparando a TVS seletiva versus de cobertura (todos os tetos/todas as vacas) e foi encontrado um risco maior de infecção intramamária ao parto em vacas tratadas seletivamente. Entretanto, houve grande heterogeneidade, que pode ser devido a fatores não medidos. Já a análise de subgrupo, nessa mesma revisão, mostrou que, para os ensaios usando selantes internos para tetos, não houve diferença no risco de infecção intramamária no parto entre os grupos e nenhuma heterogeneidade estava presente. Dessa forma, o uso de selantes de tetos é uma recomendação interessante para os produtores que desejam reduzir o uso de antibióticos.

O acúmulo de sujeira na área de pós-ordenha também esteve associado com maior prevalência de mastite subclínica nos rebanhos, evidenciando que as condições ambientais estão relacionadas à contaminação da glândula mamária. Outros estudos mostraram que a limpeza e higiene foi associada com mastite em rebanhos tanto a pasto (SULEIMAN; KARIMURIBO; MDEGELA, 2018) quanto confinados (DEVRIES et al., 2012). A limpeza da área de pós-ordenha está diretamente relacionada ao risco que as vacas estão expostas nos primeiros 30 minutos após a ordenha, período aproximado em que o esfíncter do teto fica relaxado. A saída dos animais pra áreas limpas, imediatamente após a ordenha, como para a

pastagem ou oferta do suplemento alimentar, favorecendo que permaneçam em estação, devem ser consideradas sempre que possível (FIRTH et al., 2019).

Portanto, é possível que, pelo menos nessa região, os sistemas a base de pasto propiciem, de modo geral, uma menor exposição à contaminação bacteriana do que nos sistemas confinados, o que explicaria, por um lado, os resultados encontrados. Instalações sujas aumentam a sujeira nas vacas, que contribuem para aumentar a incidência de mastite (DOERFLER et al., 2018; RAMÍREZ et al., 2014; ECKELKAMP et al., 2016). Conseqüentemente, manter instalações limpas é uma importante medida profilática a ser tomada contra a mastite, principalmente por agentes ambientais (KLAAS; ZADOKS, 2018). Por outro lado, os sistemas confinados possuíam rebanhos maiores, o que também aumenta o risco devido à maior exposição entre animais, bem como a maior produtividade pode aumentar a suscetibilidade.

Independentemente do nível tecnológico, todos os estabelecimentos estudados careciam de estratégias claras para o controle e monitoramento da saúde da glândula mamária, principalmente para reduzir o número de novas infecções, eliminar infecções estabelecidas e diminuir a duração das infecções através do uso das técnicas recomendadas. Nenhuma das UPs realizava periodicamente diagnóstico de mastite, não separavam a ordenha de animais infectados e, por consequência, não usavam os dados para implementar medidas profiláticas de manejo. Embora os manuais de boas práticas de ordenha orientem que as vacas sejam ordenhadas de acordo com a saúde da glândula mamária e já tenha sido demonstrado que não deixar os animais infectados por último tem maior risco de novos casos (CARDOZO et al., 2015), na prática essa recomendação é difícil de ser seguida. Em parte devido ao comportamento natural de bovinos, que gostam de rotinas e não de mudanças no grupo social. BROUCEK et al. (2013) observaram que vacas múltiparas entram na sala de ordenha antes das primíparas e a realocação em lotes impacta o comportamento e até mesmo a produção de leite. Por isso, os produtores muitas vezes não conseguem estabelecer linha de ordenha.

Portanto, as recomendações devem ser elaboradas conforme as características dos sistemas e a capacidade de implementação dos produtores. Por exemplo, em rebanhos pequenos, se houver dificuldade dos produtores seguirem as recomendações de linha de ordenha, então, a adoção de pré e pós-*dipping* e desinfecção das teteiras entre ordenhas deve ser obrigatória. Nos rebanhos maiores, onde há possibilidade de formação de lotes, deve-se considerar, pelo menos, o alojamento das novilhas separadamente das vacas mais velhas (MCDOUGALL et al., 2009), principalmente as doentes.

Problemas de saúde do úbere são frequentes em todos os sistemas de produção. Estudos conduzidos em sistemas orgânicos apontam diversos problemas de saúde do úbere (HANSMANN; VOLLING; KRÖMKER, 2019) com um desempenho semelhante aos sistemas convencionais. No entanto, uma recente revisão sistemática indica que, apesar dos sistemas orgânicos permitirem mais alto nível de bem-estar por propiciar liberdade de comportamentos da espécie, os principais problemas de saúde são semelhantes aos das fazendas não orgânicas e, especialmente, mastite e claudicação precisam ser melhoradas (ÅKERFELDT et al., 2020). No caso em estudo, os protocolos de saúde dos produtores agroecológicos parecem reduzidos à substituição das drogas de uso restrito por terapias permitidas neste sistema em detrimento de ações preventivas. Fato semelhante é relatado por POIZAT et al. (2017) que apontam o uso de tratamentos seletivos como a principal diferença entre produtores orgânicos e convencionais. HONORATO et al. (2014) identificaram que os produtores orgânicos usam as seguintes estratégias para reduzir a incidência de doenças: uso de genótipos adaptados, aumento da adoção de medidas preventivas de saúde, uso de terapias alternativas e a redução de alimentos concentrados, no entanto, esses produtores tinham um nível de produtividade por vaca inferior.

No presente estudo os sistemas baixo insumo dispõem de menor área em relação ao alto insumo, mas ambos utilizam as pastagens de maneira similar, com proporção semelhante de pastagens perenes e anuais, e com maior proporção de pastagens anuais. Já os produtores agroecológicos têm essa relação invertida, com maior proporção de pastagens perenes do que anuais. Para BALCÃO et al. (2017) o sistema à base de pasto baixo insumo pode ser considerado remanescente de produtores que originalmente produziam apenas para o sustento familiar que de diferentes maneiras ampliaram sua escala de produção todavia, mantendo técnicas e métodos tradicionais. As principais diferenças entre os sistemas à base de pasto baixo insumo, alto insumo e agroecológico se fundamentam em três aspectos: a) disponibilidade e forma de uso das terras; b) tamanho do rebanho e produção diária de leite; c) alimentação dos animais (KUHLEN et al., 2015). Nosso estudo corrobora com os demais realizados na região (BALCÃO et al., 2017; COSTA et al., 2013; KUHLEN et al., 2015) que evidenciam a necessidade de estratégias e políticas direcionadas aos diferentes tipos de produtores a coexistirem na cadeia produtiva do leite, uma vez que todos cumprem papéis fundamentais, seja no atendimento à demanda por produtividade leiteira ou na contribuição para a manutenção dos ecossistemas.

Variações expressivas de manejo e de infraestrutura foram encontradas dentro dos mesmos sistemas. Por exemplo, nos sistemas de *freestall* é indicada a utilização de limpeza

mecânica automatizada (DOERFLER et al., 2018). Contudo, nem todas as UP's dispunham deste equipamento, resultando em um número menor de limpezas por dia, propiciando um ambiente de maior risco à mastite (DEVRIES et al., 2012; DOERFLER et al., 2018; SOUZA; MARIA; PINHO, 2015). ECKELKAMP et al. (2016) avaliaram a limpeza e saúde do úbere de vacas em sistema de *freestall* com cama de areia e em sistema de compostagem com cama e concluíram que, quando gerenciado adequadamente, os dois sistemas são semelhantes.

No caso dos confinamentos do tipo *compost barn*, as diferenças entre as UP's não foram menos expressivas. No caso da infraestrutura, a área por vaca, o sistema de ventilação e a área de alimentação (dentro ou fora da área de cama) pode ter influenciado os resultados. Em ambos os casos, a demanda energética é elevada. O sistema de *freestall*, para um bom manejo, necessita *scraper* operando dia e noite, assim como, no sistema de *compost barn*, a ventilação é utilizada o ano inteiro para auxiliar na secagem e aeração da cama como no conforto térmico dos animais (ADAMS et al., 2017; FERNÁNDEZ et al., 2020; HEINS et al., 2019; LESO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019).

Em relação a sala de ordenha, os estabelecimentos de sistemas de produção de leite em confinamento, foram os que dispunham de melhor infraestrutura. Todos eles com sistema de ordenha canalizada e sala de ordenha em formato de espinha de peixe e alguns com piso emborrachado na sala de ordenha. Em relação aos cuidados e manejo da ordenha apresentaram variação, o que deve ter influenciado nos resultados. Também os cuidados com a saúde do úbere e tipo de medicação utilizada apresentou diferenças. Dois dos estabelecimentos estudados (um *freestall* e um *compost barn*) utilizavam exclusivamente produtos homeopáticos para prevenção e tratamento da mastite.

A disparidade no tamanho dos rebanhos e número de rebanhos entre os diferentes sistemas é uma limitação deste estudo, no entanto, essa limitação reflete a realidade da região. Devido ao presente estudo ser focado na prevalência e fatores associados a mastite não podemos afirmar que os resultados representam associações causais entre as variáveis testadas e a mastite. Porém, mais uma vez ficou evidenciado que a limpeza e a higiene das instalações de ordenha são importantes para se reduzir a ocorrência e a disseminação da mastite, especialmente áreas pós-ordenha (KAPPES et al., 2020).



#### 4.6 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, os rebanhos confinados apresentaram maior prevalência de mastite que os rebanhos com acesso a pasto. Independentemente do nível tecnológico, todos os estabelecimentos estudados careciam de estratégias claras para o controle e monitoramento de mastite. Os fatores maiores paridade, prevalência de mastite clínica e sujidade na área pós-ordenha, mostraram associação com maior prevalência de mastite subclínica, independente do sistema.

## 5 CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO E SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DE LEITE ISOLADAS DE DIFERENTES SISTEMAS PRODUTIVOS

### 5.1 RESUMO

Os animais de produção têm sido reconhecidos como reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos. A prevalência da resistência está relacionada ao tamanho de rebanho e intensividade do sistema produtivo. O Brasil é um dos *hotspots* emergentes de resistência bacteriana, estando associada também à produção animal. Desse modo, nosso objetivo foi avaliar o perfil de resistência de patógenos causadores de mastite subclínica e a relação do status de resistência no nível de fazenda com sistemas produtivos em diferentes intensidades de produção. Amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica foram coletadas de fazendas em manejo agroecológico, baixo insumo, alto insumo e confinamentos *Freestall* e *Compost barn*. O isolamento e a identificação microbiológica dos agentes etiológicos foram realizados, seguido dos testes de susceptibilidade aos antibióticos usando o ensaio de disco-difusão. Os principais agentes isolados foram *Streptococcus* spp. (n=54, 30,5%) e *Staphylococcus-coagulase* positivos (SCP) (n=54; 30,5%). O nível de resistência a antibióticos foi 99,43%, sendo maior a Sulfametazina (80,2%), Gentamicina (29,37%), Penicilinas (29,37%), Oxacilinas (28,82%) e Ampicilinas (26%). A multirresistência (MDR) foi encontrada para todos os agentes e todos os sistemas (39,54%). Sistema de produção (p=0.26) e fazenda (p=0.24) não apresentaram efeito significativo sobre a porcentagem de resistência das amostras. Portanto, a intensificação da produção pode não resultar em aumento nas taxas de resistência antimicrobiana na cadeia produtiva do leite, devendo-se avaliar demais fatores ambientais. Destacamos os altos níveis de multirresistência encontrados, mesmo em bactérias até então consideradas como patógenos menores, o que sinaliza um alerta sobre bactérias ambientais como potenciais transmissoras de genes de resistência no ambiente.

### 5.2 INTRODUÇÃO

A ampla utilização das mesmas classes de antibióticos, tanto para a saúde humana como animal, vem despertando preocupação das principais organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a

Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). O uso crescente e descontrolado dos antimicrobianos na produção animal, na forma de aditivos alimentares e uso profilático, para aumento de produtividade e manutenção da saúde, é um tema que de fato preocupa pela resistência bacteriana envolvida e pelo impacto negativo na saúde humana e animal. A OMS alerta que a resistência bacteriana atinge níveis crescentes em várias partes do mundo, podendo ser a próxima pandemia que a humanidade irá enfrentar. Para algumas circunstâncias já estão relatadas poucas opções disponíveis de tratamentos eficazes para infecções comuns (WHO, 2014).

Em uma revisão sistemática de prevalência da resistência antimicrobiana (RAM) em animais e seus produtos em países em desenvolvimento, VAN BOECKEL et al. (2019) reportaram o Brasil como um dos *hotspots* emergentes de resistência para as bactérias investigadas (*E. coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* não tifoide, *Salmonella* spp. e *S. aureus*), comumente associadas à produção animal. Neste estudo, as maiores taxas de resistência foram observadas nas classes mais usadas na produção animal: tetraciclina, sulfonamidas e penicilinas (VAN BOECKEL et al., 2019). Para a preservação da efetividade dos antibióticos, essenciais na medicina humana, seguindo as orientações da OMS, foi preconizada no Brasil pela Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS), a restrição completa de todas as classes de antimicrobianos importantes na medicina humana, em uso na alimentação animal (Portaria n 171 de 2018, IN n 1 de 2020). Nos EUA, apenas duas classes de antimicrobianos estão representadas entre os produtos comercialmente disponíveis que são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA):  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, ceftiofur, cefapirina, cloxicilina, hetacilina e penicilina) e uma lincosamida (pirlimicina) e não há antimicrobianos autorizados para o tratamento sistêmico da mastite; no entanto, o uso extra-bula de alguns antibióticos é permitido sob supervisão veterinária (RUEGG, 2017).

Em termos de produção animal, a produção intensiva é mais comumente associada com o crescente surgimento de bactérias resistentes (MANYI-LOH et al., 2018; KALUPAHANA et al., 2019). Por exemplo, a prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associada aos rebanhos (LA-MRSA) em criações de suínos convencionais na Holanda, é cerca de 71% (VAN DE VIJVER et al., 2014), enquanto em rebanhos menores e ao ar livre, a prevalência no nível de fazenda é em torno de 10% (KALUPAHANA et al., 2019). Em sistemas de produção orgânica, o uso de antibióticos é bastante restrito pelos órgãos reguladores no mundo todo e, portanto, espera-se que o nível de resistência nestes rebanhos também seja menor do que nos convencionais (TIKOFISKY et al., 2003).

Até o surgimento de superbactérias resistentes a antibióticos, não se dava importância epidemiológica à exploração industrial de animais, já que essas bactérias eram associadas apenas às infecções hospitalares, a exemplo de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA). O reconhecimento de animais de produção como extenso reservatório dessas cepas (LA-MRSA) é relativamente recente, mas já registrado no mundo todo (VOSS et al., 2005; CUNY et al., 2015; SCHULZ et al., 2018), cuja prevalência também é relacionada ao tamanho de rebanho (GRAVELAND et al., 2011) e intensividade do sistema produtivo (CUNY et al., 2012; FEINGOLD et al., 2012).

Investigações em fazendas leiteiras encontraram 47% de resistência a oxacilina e taxas menores para penicilina (23.3%) e tetraciclina (15.8%), em isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) no leite, dos quais 15% foram multirresistentes (FREY et al., 2013). Portanto, essas espécies são potenciais reservatórios para genes de resistência, que podem ligar espécies estafilocócicas colonizadoras de hospedeiros às bactérias ambientais (SCHOENFELDER et al., 2017). É provavelmente impossível evitar a transferência de resistência entre patógenos (bem como os comensais próximos evolutivos), uma vez que compartilham habitats e, quase sempre, relacionados filogeneticamente (BENGTSSON-PALME et al., 2017). Então, é importante se conhecer a distribuição de RAM entre patógenos considerados inofensivos ou oportunistas, como são conhecidos os estafilococos coagulase-negativos (SCN). Essas espécies, apesar de reconhecidas como colonizadoras naturais e exercerem efeito protetor, por vezes, estão envolvidas em mastites clínicas e subclínicas de rebanhos leiteiros (IDF, 2017). A ocorrência dos mesmos genes de resistência nos SCN e *S. aureus* sugere uma troca genética contínua entre LA-MRSA e outros estafilococos cujas forças motrizes no nicho ecológico do ambiente agrícola ainda são pouco conhecidas (SCHOENFELDER et al., 2017). Dessa forma, entende-se porque infecções persistentes são cada vez mais frequentes nos rebanhos, causando grandes perdas econômicas e prejuízo ao bem-estar animal, muitas vezes decorrentes do consumo inadequado de antibióticos. No Brasil, PIZAURO et al. (2019), investigaram amostras de leite de búfala e sugeriram que os isolados de SNC podem não ser uma causa significativa de mastite clínica ou mesmo subclínica nessa espécie, mas podem ser um reservatório de virulência e genes de resistência aos antibióticos.

Diante disso, o monitoramento da resistência antimicrobiana no nível de fazenda, em diferentes sistemas de criação, é o primeiro passo para identificar a resistência emergente em rebanhos leiteiros e é fundamental para o embasamento de estratégias de mitigação do problema, como a transição para uma produção animal sustentável e uso racional de antimicrobianos. Com esse objetivo, nesse estudo avaliamos o perfil de resistência de patógenos

causadores de mastite subclínica e a relação do status de resistência no nível de fazenda, com sistemas produtivos em diferentes intensidades de produção, i.e., agroecológico, baixo insumo, alto insumo e confinamentos *Freestall* e *Compost barn*.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.3.1 Seleção das Unidades de Produção (UP) e amostragem de leite

O estudo foi realizado em rebanhos leiteiros distribuídos em 16 municípios do Oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. Os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Protocolo nº CEUA nº 7488201117) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Os produtores convidados a participar da pesquisa foram contatados por pessoas que realizam assistência técnica e social (ATES) na área de estudo. Os critérios de inclusão utilizados para o recrutamento das Unidades de Produção foram os seguintes: a) enquadramento nos sistemas de produção estudados; b) disponibilidade e consentimento para participar do estudo; c) facilidade de acesso. Foram visitadas 74 UP durante 2016 e 2017, porém, a amostragem de leite desse estudo é referente a 47 dessas, porque foram utilizadas somente as amostras que tiveram crescimento bacteriano e identificação do agente.

As unidades de produção visitadas adotavam diferentes sistemas de manejo à base de pasto e confinamento. As seguintes tipologias de sistemas de manejo para produção de leite, adaptadas de BALCÃO et al. (2017) e KUHNNEN et al. (2015), mais os sistemas confinados, foram considerados:

- A. Manejo à base de pasto com princípios agroecológicos (orgânicos e/ou em transição para certificação orgânica), denominado “agroecológico”: Estas UP’s possuem pastagens manejadas sob o sistema de Pastoreio Racional Voisin (MACHADO, 2010). O manejo sanitário é restrito a utilização de produtos e insumos permitidos pela legislação de orgânicos (MAPA, 2011). 21UP representam esse sistema, com tamanho médio dos rebanhos é de 11 vacas em lactação, com predominância de raças mistas.
- B. Manejo à base de pasto com baixa utilização de insumos industriais, denominado “pasto baixo insumo”: Este sistema de manejo é considerado o mais antigo e tradicional na região. Em alguns casos são produtores sazonais, conforme a disponibilidade forrageira. Geralmente utilizam pastagens naturais permanentes, com pequenas áreas de pastagens

artificiais e a quase ausência do uso de fertilizantes. Suplementam os animais esporadicamente em situações de escassez de pastagens. Possuem instalações simples em muitos casos adaptadas e aproveitadas de outras atividades. 23 UP representam esse sistema, com tamanho médio dos rebanhos de 13 vacas em lactação, com predominância de raças mistas.

- C. Manejo à base de pasto com alta utilização de insumos industriais, denominado “pasto alto insumo”: Os produtores deste sistema utilizam tecnologias dependentes de insumos industriais, como pastagens temporárias de elevada produtividade (pastagens anuais de inverno e de verão) e seguem recomendações técnicas convencionais do uso de fertilizantes de síntese química e agrotóxicos. Os animais são suplementados praticamente o ano inteiro com silagem e concentrado. 21 UP representam esse sistema, com tamanho médio dos rebanhos de 17 vacas em lactação, com predominância da raça holandês.
- D. Sistema de manejo em confinamento – tipo estabulação livre (*freestall*): Geralmente adotado por produtores oriundos do sistema “pasto alto insumo” que buscam ampliar sua escala de produção. Quatro UPs representam esse sistema, com tamanho médio dos rebanhos de 56 vacas em lactação, com predominância de raças holandês.
- E. Sistema de manejo em confinamento – tipo compostagem em galpão (*compost barn*): É o sistema mais recente e em maior expansão na região de estudo. Como em outras regiões do mundo é considerado uma alternativa ao *freestall*. Cinco UP representam esse sistema, com tamanho médio dos rebanhos de 53 vacas em lactação, com predominância da raça holandês.

Durante as visitas às UP, foi realizado acompanhamento de ordenha e foram examinadas todas as vacas em lactação. A mastite clínica foi avaliada por inspeção das vacas dirigida a determinar o estado geral do animal e sinais específicos de inflamação no úbere (edema, dor) e avaliação dos três primeiros jatos de leite. A mastite subclínica foi avaliada usando o reagente *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) e sua interpretação foi realizada considerando-se positivas as amostras que tiveram formação de gel e negativas para as que não tiveram reação (RADOSTITS et al., 1994). Todos os quartos com CMT positivos tiveram amostras de leite coletadas, individual e asépticamente, e casos de mastite clínica não foram coletados.

### 5.3.2 Exames bacteriológicos

As amostras de leite foram inoculadas em placas de ágar-sangue, que foram divididas em 6 quadrantes. Uma alça de 10µL foi usada para espalhamento e as amostras foram incubadas por 24 a 72h a 37°C e examinado quanto ao crescimento bacteriano. Culturas puras foram examinadas em busca de características morfológicas, de coloração e, se necessário repique em outra placa. Os estafilococos, em particular, foram diferenciados em *S. coagulase* positiva (SCP) e negativa (SCN) de acordo com a morfologia das colônias no ágar-sangue (sangue de ovelha desfibrinado a 5%, Laborclin), coloração de Gram, produção de catalase e coagulase em lâmina utilizando plasma de coelho (Quinn et al, 2005). As amostras foram criopreservadas em tubos de 1,5mL, utilizando meio crioprotetor (5% de sacarose, 0,6% de glutamato e 2,5% de caseína peptona).

### 5.3.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Foi possível realizar o isolamento e identificação dos agentes em 177 amostras, as quais foram submetidas aos antibiogramas. Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos os isolados foram revividos por subcultura em ágar-sangue a 35°C por 24h. Os isolados foram testados conforme descrição do NCCLS (2003), quanto à sua suscetibilidade a 16 antimicrobianos diferentes, incluindo 2 associações. As classes dos antimicrobianos avaliados foram B lactâmicos: Penicilinas (ampicilina e oxacilina) e Cefalosporinas (cefalexina, ceftiofur, cefalotina), Aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina), Sulfonamídeos (sulfametazina, trimetoprina), Macrolídeos (eritromicina), Quinolonas (ciprofloxacina), Fluorquinolona (enrofloxacina) Glicopeptídeos, Tetraciclina e Lincosamidas (clindamicina). Resumidamente, os discos de antimicrobianos foram pressionados suavemente para garantir o contato com a superfície de ágar Mueller-Hinton inoculada com as suspensões bacterianas ajustadas ao padrão de turbidez de 0,5 da escala McFarland e incubadas a 35°C por 18 a 24h. Após esse tempo, as placas foram examinadas e as zonas de inibição foram medidas e interpretadas de acordo com a tabela do fabricante (Laborclin) como suscetíveis, intermediários ou resistentes. Após, as categorias suscetível e intermediário foram agrupadas, de forma que se obteve somente duas categorias: suscetível e resistente. Foram consideradas multirresistentes (MDR) as amostras que fossem fenotipicamente resistentes a 3 ou mais grupos de agentes antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2010).

### 5.3.4 Análise estatística

A informação da porcentagem de antibióticos resistentes para cada amostra foi utilizada como variável resposta na análise estatística para verificar possíveis diferenças no perfil de resistência considerando os sistemas e agentes estudados. A análise de variância foi realizada considerando como variáveis dependentes o sistema, o agente, a propriedade aninhada em sistema e as interações. As médias das variáveis que apresentaram-se significativas na análise de variância foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando programa computacional R (R Core Team, 2020). Para a análise estatística não foi considerada as amostras em que o agente foi identificado como *Prototheca spp.*

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Principais agentes identificados na mastite subclínica

Nesse estudo investigamos a resistência à antimicrobianos (RAM) de quatro grupos de bactérias isoladas de mastite subclínica de vacas leiteiras, i.e., *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), Corineformes e *Streptococcus* spp. Cabe destacar que o perfil bacteriano encontrado nesse estudo se pode atribuir, em parte, ao viés metodológico, devido às mastites clínicas estarem em tratamento no momento das coletas. Desse modo, foram obtidas somente amostras de mastites subclínicas, resultando no isolamento das espécies mais frequentes nesses tipos de mastite. Foi possível fazer a identificação microbiológica e antibiograma de 177 amostras, nas quais os agentes *Streptococcus* spp. (n=54; 30,5%) e *Staphylococcus*-coagulase positivos (SCP) foram os mais comumente isolados (n=54; 30,5%), seguidos por *Staphylococcus*-coagulase negativos (SCN; n=35; 19,8%) e Corineformes (n=32; 18,1%). A *Prototheca* spp. foi isolada de 2 amostras (1,1%) de um estabelecimento do sistema *Compost barn* (Tabela 8).

A importância das espécies SCP e *Streptococcus* nas mastites clínicas e subclínicas, contagiosas e ambientais, já é bem conhecida e estudada (MONISTERO et al., 2018; TIAN et al., 2019). Portanto, destacaremos aqui a alta prevalência de SCN encontrada nesse estudo, o que corrobora com outros que tem demonstrado a emergência dessa categoria como patógeno (DE VISSCHER et al., 2017). Atualmente eles representam os patógenos intramamários mais prevalentes nas mastites subclínicas (JENKINS et al., 2019). Apesar da menor patogenicidade,



essas espécies podem causar infecções persistentes (VANDERHAEGHEN et al., 2014; JENKINS et al., 2019) ao contrário do que se acreditava há muito tempo. Da mesma forma, há controvérsias com relação ao papel das bactérias Corineformes na etiologia da mastite (LANGONI et al., 2017). Não pretendemos discutir aqui a capacidade desses patógenos menores em proteger ou não da invasão de patógenos maiores, mas destacar sua importância como agentes de infecções subclínicas e seu papel na propagação de resistência aos antimicrobianos. Nesse trabalho também confirmamos a alta contagiosidade dessas espécies, como já descrito por LANGONI et al. (2017), o que indica manejo sanitário inadequado, independente do sistema de produção. A presença de *Prototheca* spp. também causa preocupação porque, apesar da baixa prevalência, essa espécie é extremamente resistente à antibioticoterapia, resultando geralmente no descarte do animal (JAGIELSKI et al., 2017).

Tabela 8. Principais agentes isolados de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica e % de resistência a antibióticos (N=177) de fazendas com diferentes tipos de manejos.

Antimicrobianos	Agentes etiológicos da mastite <sup>a</sup>											
	<i>Streptococcus spp.</i> (n <sup>a</sup> =54, 30,5%)		SCP <sup>b</sup> (n=54, 30,5%)		SCN <sup>c</sup> (n=35, 19,7%)		Corineforme (n=32, 18,1%)		Prototheca (n=2, 1,1%)		Resistência total	
	Resistencia											
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampicillina	10	18,5	14	25,9	7	20	14	43,8%	2	100	47	26,5%
Cefhalexina	8	14,8	6	11,1	3	8,6	9	28,1%	2	100	28	15,8%
Cefalotina	0	0	2	3,7	2	5,7	6	18,8%	2	100	12	6,8%
Ciprofloxacina	4	7,4	5	9,3	2	5,7	4	12,5%	2	100	17	9,6%
Clindamicina	15	27,8	5	9,3	7	20	13	40,6%	2	100	42	23,7%
Enrofloxacina	2	3,7	8	14,8	3	8,6	6	18,8%	2	100	21	11,9%
Eritromicina	7	13	7	13	6	17,1	8	25,0%	2	100	30	16,9%
Gentamicina	21	38,9	13	24,1	7	20	9	28,1%	2	100	52	29,4%
Neomicina	11	20,4	6	11,1	4	11,4	10	31,3%	0	0	31	17,5%
Oxacillina	16	29,6	10	18,5	7	20	15	46,9%	2	100	50	28,2%
Penicillina	13	24,1	15	27,8	7	20	15	46,9%	2	100	52	29,3%
Pen+Neo	6	11,1	1	1,9	3	8,6	4	12,5%	0	0	14	7,9%
Sulfametazina	39	72,2	45	83,3	30	85,7	26	81,3%	2	100	142	80,2%
Tetraciclina	17	31,5	4	7,4	9	25,7	2	6,3%	2	100	34	19,2%
Trimetroprina	5	9,3	5	9,3	2	5,7	7	21,9%	0	0	19	10,7%
Sulfa+trimet	0	0	0	0	1	2,9	6	18,8%	2	100	9	5,1%

<sup>a</sup>Número de isolados e porcentagem por agentes; <sup>b</sup>SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positivo; <sup>c</sup>SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativo.

#### 5.4.2 Nível de resistência aos antimicrobianos

O nível de resistência a antibióticos foi muito alto (99,43%). Apenas uma amostra, das 177 testadas, apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados, as demais apresentaram resistência ao menos um dos antibióticos. A maior porcentagem de resistência antimicrobiana foi encontrada em Sulfametazina (n=142, 80,2 %), seguidos de Gentamicina (n=52; 29,37%), Penicilinas (n=52; 29,37%), Oxacilinas (n=50; 28,82%) e Ampicilinas (n=47; 26%). Para Sulfametazina, os dois agentes de maior prevalência foram *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 1). Os antimicrobianos que apresentaram sensibilidade acima de 90% foram SUT (Sulfa+Trimetoprina) (n=168; 94,91%), CFL (Cefalotina) (n=165; 93,2%) e PNM (Penicilina+Neomicina) (n=163; 92,1%).

Em relação à sensibilidade por agentes observamos que todas as amostras de *Streptococcus spp.* foram sensíveis a SUT e CFL e todas as amostras de S. Coagulase Positiva foram sensíveis ao SUT (Tabela 1). Diferentemente dos agentes S. Coagulase Negativa e Corineformes que tiveram amostras resistentes em todos os antibióticos testados (Tabela 1). O

antibiótico Tetraciclina foi o mais sensível para o grupo dos Corineformes. As duas amostras de *Prototheca* spp. apresentaram sensibilidade à neomicina, trimetropima e penicilina+neomicina, sendo resistentes a todos os demais antimicrobianos (Tabela 1). O grupo dos Corineforme foi resistente em média a 32,4% dos antibióticos testados, seguido dos SCN (20,1%). Já *Streptococcus* (17,8%) e SCP (16,9%) não diferiram quanto a resistência ( $p>0,05$ ).

A pronunciada resistência à sulfametazina nesse estudo, tão maior em comparação aos demais princípios ativos, leva a suspeitar de sua maior frequência de uso. De fato, o relatório de monitoramento de resíduos no leite do PAMVET (ANVISA, 2009) revelou a presença de neomicina, sulfadimetoxina, sulfatiazol e sulfametazina em amostras coletadas no estado de Santa Catarina, indicando que esses medicamentos são de uso frequente e, muitas vezes, inadequado. Alguns autores descrevem associação entre frequência de uso e RAM. FREITAS et al. (2005), por exemplo, verificaram alto nível de resistência à gentamicina principalmente no município onde este antibiótico era mais frequentemente utilizado para tratar os animais com mastite. SANTIAGO-NETO et al. (2014) observaram que vacas com três a quatro anos tiveram 13,7 vezes mais chances de ter estafilococos coagulase-positivo multirresistentes em comparação com mais jovens. Para esses autores, o tempo de exposição a agentes infecciosos e consequentes terapias sugere uma maior chance de colonização do úbere por patógenos resistentes devido à pressão de seleção repetida durante a vida. Em escala mundial, VAN BOECKEL et al. (2019) mapearam as tendências nas taxas de resistência antimicrobiana entre animais para alimentação em países de baixa e média renda e encontraram um aumento global, entre 2000 e 2018, na proporção de compostos antimicrobianos que mostraram resistência superior a 50 por cento (P50). Esses autores observaram maiores taxas de resistência nas classes de antimicrobianos mais comumente usadas na produção animal: tetraciclina, sulfonamidas e penicilinas, evidenciando mais uma vez a associação entre frequência de uso e aumento de RAM.

Os demais antimicrobianos testados no nosso estudo tiveram taxas consideradas baixas (até 10%) e moderadas (até 30% de resistência) (Tabela 8), porém, cabe salientar que alguns desses, como ciprofloxacina, eritromicina e gentamicina, são classificados como criticamente importantes para a medicina humana (WHO, 2016). Portanto, estes devem ser utilizados com maior restrição em animais. Também é preciso contextualizar a forma como os antimicrobianos são administrados nos estabelecimentos rurais. À priori, o tratamento é iniciado empiricamente pelos produtores, sem diagnóstico microbiológico, priorizando antimicrobianos de amplo espectro (LANGONI et al., 2017). Nessa realidade, os níveis de resistência aqui encontrados dificultam enormemente os tratamentos, uma vez que 99% das amostras foram resistentes a um

ou mais antibióticos. Na prática, isso resulta em grande chance de uso de antimicrobianos ineficazes e/ou aumento na dosagem dos mesmos, ou seja, uma bola de neve em direção ao desenvolvimento de RAM. Somando-se a isso, atualmente sabe-se que há uma correlação positiva entre o uso de antibióticos de amplo espectro e maiores proporções de bactérias resistentes (HUGHES, 2014; PAHARIK et al., 2017), o que torna essa estratégia cada vez mais questionável. Portanto, por mais que geralmente exista algum antibiótico que funcione, na prática, essas taxas de resistência constituem um problema tanto econômico, ambiental e de saúde humana e animal.

### **5.4.3 Resistência antimicrobiana nos diferentes sistemas de produção**

Sistema de produção ( $p=0,26$ ) e fazenda ( $p=0,24$ ) não apresentaram efeito significativo sobre a porcentagem de resistência das amostras (Figura 1). Houve efeito significativo entre agentes ( $p=0,005$ ) sobre o número de amostras resistentes, enquanto as interações não foram significativas ( $p>0,05$ ). O fato de não encontramos diferenças na RAM entre os sistemas de produção sugere, a exemplo de outros estudos (LOO et al., 2019), que o uso de antimicrobianos pode não ser o único fator que causa o surgimento de RAM em animais, pelo menos não diretamente observável, especialmente na espécie bovina. Em uma revisão sistemática TANG et al. (2017) encontraram uma associação entre as intervenções que restringem o uso de antibióticos e a redução na prevalência de bactérias resistentes a antibióticos. Entretanto, essas estimativas pareceram mais fortes quando a intervenção foi direcionada a suínos e aves do que para bovinos. Segundo os autores, as práticas de criação de suínos e aves são geralmente mais intensivas (com maior número de animais e potencialmente maior uso de antibióticos), e a administração de antibióticos nessas espécies tende a ser no rebanho, não no animal individual como ocorre em bovinos. Portanto, as intervenções na suinocultura e na avicultura provavelmente resultarão em maiores reduções gerais no uso de antibióticos do que em bovinos (TANG et al., 2017).

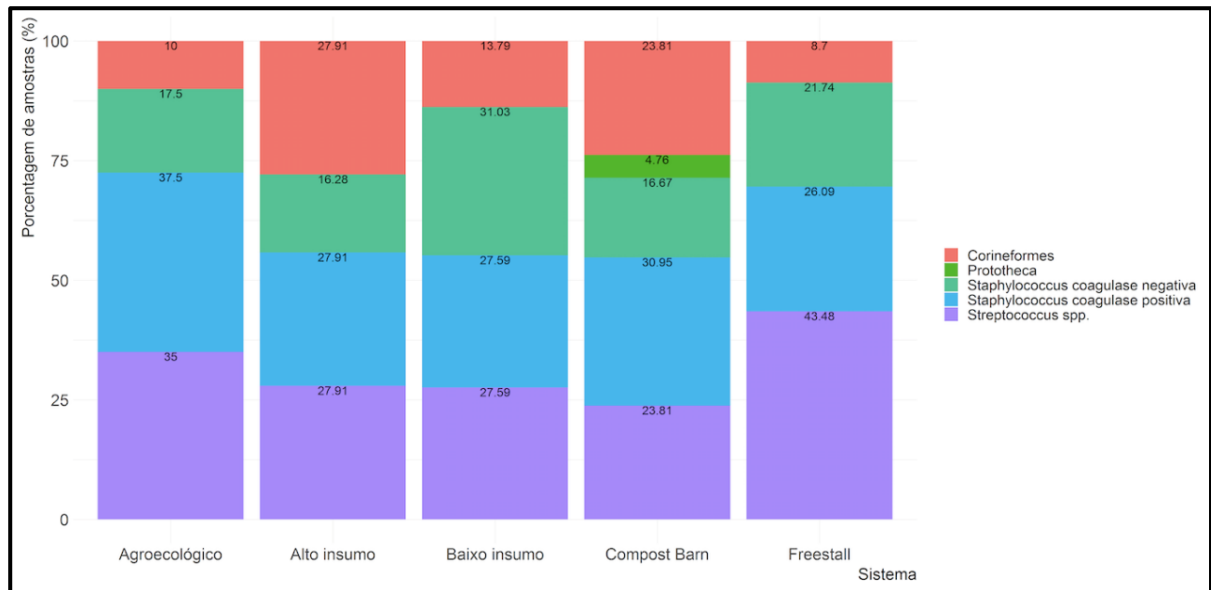


Figura 1. Porcentagem de amostras resistentes para cada agente isolado nos diferentes sistemas avaliados.

Outra possibilidade é que como o uso de antimicrobianos não foi quantificado no presente estudo (os produtores não costumavam anotar e consideramos os poucos registros não confiáveis), esse resultado tenha decorrido da falta de homogeneidade no uso dentro dos sistemas produtivos. Porém, um estudo que investigou exatamente essa quantificação encontrou algumas fortes associações entre o tipo de rebanho e o status de suscetibilidade, mas outras não (POL; RUEGG, 2007). Da mesma forma, um efeito dose-resposta entre a exposição aos antimicrobianos e a suscetibilidade foi observado para algumas combinações patógeno-antimicrobiano, mas a exposição a outros medicamentos antimicrobianos comumente usados para prevenção e tratamento da mastite não foi associada à resistência (POL; RUEGG, 2007). Por outro lado, a maioria dos isolados obtidos de ambos os tipos de fazenda (Orgânico e Convencional) foram inibidos na concentração mais baixa de todos os  $\beta$ -lactâmicos (POL; RUEGG, 2007), o que nos leva novamente a pensar que os resultados são influenciados por esferas de decisão maiores, em nível de programas nacionais de uso de antimicrobianos. Por exemplo, enquanto nos Estados Unidos, desde 2006, são utilizadas apenas 2 classes de antimicrobianos que incluem 6 ou 7 produtos intramamários que contêm  $\beta$ -lactâmicos e 1 produto que contém pirlimicina (OLIVEIRA; RUEGG, 2014), no Brasil existem 166 produtos veterinários comerciais para o tratamento da mastite (RABELLO et al., 2020).

Temos também que considerar que reduzir o consumo de um antibiótico pode atrasar o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, mas não revertê-la. Em uma revisão sobre o impacto de intervenções no uso de antimicrobianos em comunidades humanas, SUNDQVIST (2014) não encontrou evidências sustentadas de reversão de RAM após diminuição do uso e

ressalta que o potencial de reverter a resistência por meio da redução do uso de antibióticos dependerá do custo de adaptação do mecanismo de resistência, do potencial epidêmico da bactéria/cepa e da via de transmissão da espécie. Esse autor conclui que podemos ter superestimado a utilidade de uma estratégia para reverter a resistência antimicrobiana com base no custo adaptativo da resistência, ao mesmo tempo em que subestimamos os efeitos conservadores da resistência associada e a importância fundamental da disseminação clonal de clones suscetíveis e resistentes. É coerente, evolutivamente, que fatores de resistência que chegam às espécies patogênicas provavelmente evoluíram no sentido de transmitir muito pouco custo de adequação a seus hospedeiros e, portanto, serão difíceis de eliminar das populações de patógenos (BENGTSSON-PALME et al., 2017).

#### **5.4.4 Multirresistência antimicrobiana**

A quantidade encontrada de isolados multirresistentes (MDR) foi o resultado mais grave e surpreendente dessa pesquisa. A multirresistência (MDR) foi encontrada para todos os agentes e todos os sistemas de produção (Figura 2). Setenta (39,54%) dos 177 isolados examinados apresentaram multirresistência, ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antibióticos testados. Das amostras testadas, 9 apresentaram resistência a todas as classes de antibióticos (5%). Os agentes bacterianos que apresentaram maior percentual de multirresistências foram *Streptococcus* spp., seguidos de SCP e *Corineformes*.

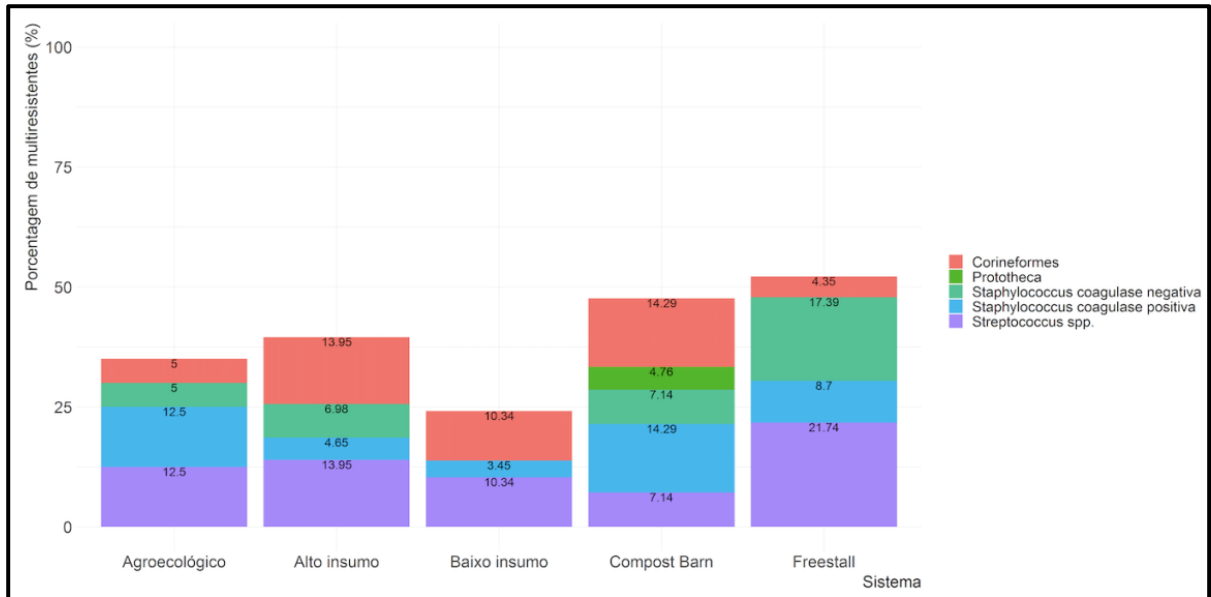


Figura 2. Porcentagem de multirresistência<sup>a</sup> microbiana dos agentes isolados em cada sistema de produção.

<sup>a</sup> Foi considerada multirresistente a apresentação de resistência à 3 ou mais classes de antibióticos (SCHWARZ, et al.,2010).

Essas taxas estão acima do encontrado na literatura internacional. BOIREAU et al., (2018), por exemplo, relataram multirresistência em 2,4% para SCP e 9,9% para *S. Uberis*, entre 2006 e 2016, na França. Tais resultados podem estar relacionados às políticas de uso de antimicrobianos que diferem substancialmente entre países. Enquanto o Brasil está classificado pela FAO/OMS/OIE no nível 2 em monitoramento de antimicrobianos, com um plano de ação ainda em desenvolvimento, outros países, como China e Estados Unidos, encontram-se no nível 5, com um plano de ação em andamento (RABELLO et al., 2020). De fato, o Brasil é o terceiro maior consumidor mundial de antimicrobianos para a produção animal e, especialmente a região estudada, está entre as regiões consideradas como pontos críticos emergentes de RAM no mundo (VAN BOECKEL et al., 2019).

Em uma revisão exaustiva sobre resistência antimicrobiana em animais de produção no Brasil, RABELLO et al. (2020) também encontraram altos índices de MDR, em aves e suínos índices bem maiores do que em bovinos mas, mesmo dentro das espécies, grande variação entre regiões, no período de tempo investigado (2009-2019). Esses autores relatam a escassez de pesquisas sobre os perfis de susceptibilidade antimicrobiana dos SCN, mas os poucos artigos encontrados mostram taxas de resistência semelhantes aos SCP, como o encontrado no presente trabalho. Da mesma forma, os princípios ativos aqui descritos como mais eficazes (quinolonas e trimetoprima/sulfametoxazol) também estão de acordo com o reportado na revisão de RABELLO et al. (2020).

A alta multirresistência encontrada no presente estudo, principalmente em bactérias consideradas comensais, como as SCN, levanta também a importância como reservatórios de resistência que essa espécie representam. Genes de resistência antimicrobiana podem ser transferidos entre espécies, via transferência horizontal de genes (THG), e a superexpressão desses genes pode conferir resistência a múltiplas drogas e até desinfetantes (HASSANZADEH et al., 2020). TÓTH et al. (2020) identificaram genes de resistência antimicrobiana de várias classes bacterianas em amostras de leite cru vendidos em mercados públicos de Budapeste. Portanto, a THG é um fenômeno que pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resistência antimicrobiana de patógenos em humanos e animais.

Por fim, a presença de resíduos de antibióticos no meio ambiente desencadeia mutação bacteriana favorecendo a resistência por pressão seletiva. Genes resistentes a antibióticos são disseminados no ambiente, como solo e águas, com potencial de troca entre bactérias ambientais e patogênicas. RIESENFELD et al. (2004) identificaram clones em amostras de solo que expressavam resistência a aminoglicosídeos e à tetraciclina, indicando que as bactérias do solo são um reservatório de genes de resistência a antibióticos com maior diversidade genética do que se sabia até então. XIAO et al. (2016) encontraram uma grande diversidade de genes de resistência à antibióticos (ARGs) em solos de arroz na China, sendo os genes de resistência a múltiplas drogas o tipo mais dominante em todas as amostras. RICE et al. (2020) revisaram estudos em águas residuais ambientais e também encontraram predominância de ARGs para tetraciclinas e multidrogas.

As evidências aqui apresentadas demonstram que sistemas mais sustentáveis, como a produção orgânica, são estratégias que devem ser adotadas para a redução e alternativas ao uso de antibióticos, mas, individualmente, são insuficientes para combater o problema da resistência aos antibióticos e apontam para a necessidade de se tratar esse tema dentro de uma perspectiva holística, que enfatize as conexões entre humanos, animais e o ambiente. Nesse sentido, SO et al. (2015) relatam as falhas nas soluções domésticas de alguns países ao problema e defendem que um acordo internacional, dentro da abordagem “One Health”, ajudaria a garantir uma coordenação global necessária, que integre coleta de dados de vigilância, monitoramento, fiscalização, pesquisa, assistência técnica e financiamento, para o combate à RAM.

LAXMINARAYAN et al. (2013) propõem vários elementos para uma estratégia global, dentre eles, que todos os países devem monitorar o uso de antimicrobianos em animais de maneira comparável, que a liberação ambiental de antibióticos de todos os setores precisa ser monitorada e controlada e fortalecer a colaboração internacional e transversal, não apenas



em pesquisa, mas especialmente entre instituições governamentais. Salientam também que a transição deve ser apoiada por serviços de extensão que forneçam conselhos sobre alternativas e como lidar com potenciais problemas negativos de saúde animal. De acordo com revisão sistemática, AARESTRUP (2015) conclui que é possível reduzir substancialmente o uso de agentes antimicrobianos na produção animal sem comprometer o bem-estar animal, a saúde ou a produção. Em alguns casos, isso deve ser feito em combinação com outras medidas, como biossegurança e uso de vacinas e lembra que a melhoria da higiene e do controle microbiológico tem sido por milênios uma parte essencial do controle de doenças infecciosas associadas à produção de alimentos.

Para soluções mais imediatas, dentro da fazenda, sugerimos adequar às recomendações que já existem para hospitais e comunidades (SUNDQVIST, 2014), como: redução do uso de antibióticos como preventivos, somente em necessidade de tratamento, antibiogramas da propriedade que permitam a adoção de antibióticos de espectro estreito com baixo impacto na flora normal e os que tenham baixa propensão de propagação clonal de resistência e instituir vacinação, sempre que possível, e tratamentos alternativos, a fim de reduzir a necessidade de tratamentos com antibióticos.

## 5.5 CONCLUSÃO

Foram encontrados altos níveis de multirresistência em todas as espécies causadoras de mastite subclínica, mesmo em bactérias até então consideradas como patógenos menores, o que sinaliza um alerta sobre bactérias ambientais como potenciais transmissoras de genes de resistência no ambiente. A intensificação de produção pode não resultar em efeito significativo nas taxas de resistência antimicrobiana, na cadeia produtiva do leite, e demais fatores ambientais envolvidos devem ser avaliados.

## 6 CAPÍTULO III - EFEITO DA MASTITE E CLAUDICAÇÃO NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE VACAS LEITEIRAS

### 6.1 RESUMO

Mastite e claudicação são as duas das maiores causas de dor, desconforto e redução do bem-estar de rebanhos leiteiros, além de representarem as maiores perdas econômicas decorrentes de enfermidades. Se são causas de desconforto e dor, então podem alterar o limiar nociceptivo durante a afecção. Nosso objetivo foi verificar se o limiar nociceptivo de vacas leiteiras é alterado na ocorrência das afecções mastite e claudicação. O estudo foi realizado em 10 granjas leiteiras em sistemas de estabulação permanente, onde foram avaliadas 501 vacas em lactação. Preliminarmente o leite de cada animal foi testado para mastite na pré-ordenha; após a ordenha, foi realizada avaliação da marcha dos animais saindo da sala de ordenha onde se atribuiu escores de claudicação. No estábulo de alimentação todas as vacas lactantes foram testadas em seu limiar nociceptivo térmico (LNT), na região dorsal da falange média do membro anterior esquerdo. Os rebanhos apresentaram alta prevalência média de mastite severa (25%), claudicação clínica (54%) e claudicação severa (escores 4 e 5, 21%) e somente 30% das vacas não apresentaram nenhuma dessas condições. As vacas apresentaram limiares térmicos aumentados conforme o grau de severidade, em relação às vacas saudáveis. A alta prevalência de processos dolorosos encontrada nesse estudo indica um comprometimento do bem-estar animal. Vacas livres de afecções responderam a temperatura média de 74,1°C, com claudicação moderada a 74,3°C, sendo diferentes ( $p>0,05$ ) das vacas com claudicação severa a 75,9°C, com mastite moderada (CMT 2 e 3) a 75,5°C e com mastite severa (mastite clínica) a 75,7°C.

### 6.2 INTRODUÇÃO

A mastite afeta rebanhos leiteiros do mundo inteiro, sendo considerada não só um problema econômico, mas também um sério problema ao bem-estar animal (BROOM; FRASER, 2010). Em que pese o desenvolvimento de diversas estratégias de controle e prevenção, a mastite continua sendo a enfermidade que mais causa prejuízos a atividade leiteira. Estima-se que devido à alta prevalência de mastite (média superior a 40%) nos rebanhos leiteiros brasileiros (BUSANELLO et al., 2017), ocorram não apenas perdas econômicas diretas, mas também perdas indiretas, com potencial risco à saúde pública. Vacas em condições

de confinamento apresentam status de imunidade baixo (HARTWIGER et al., 2019), o que pode deixá-las mais vulneráveis às doenças de produção, como mastite e claudicação.

A claudicação é a terceira maior causa de perda econômica, depois da mastite e distúrbios reprodutivos (ÓZSVÁRI, 2017). Produtores e técnicos subestimam sua prevalência e, por conseguinte, os prejuízos econômicos e ao bem-estar dos animais. Estudos realizados nos EUA (COOK, 2003) e Reino Unido (BARKER et al., 2010) indicam que a prevalência de claudicação em rebanhos leiteiros é superior a 30%, enquanto os produtores relatam somente em torno de 10% (FULWIDER et al., 2008), portanto, há falhas no diagnóstico. Em trabalho realizado no Sul do Brasil, BRAN et al. (2018) encontraram prevalência média de 31% em rebanhos em sistemas de produção à base de pasto e até 68% em sistemas confinados (BRAN et al., 2019), o que ilustra bem a maior prevalência e severidade da claudicação no confinamento.

A mastite é relativamente fácil de ser diagnosticada. No entanto, não é o diagnóstico da enfermidade que ocasiona melhoria no bem-estar, mas o tratamento da doença e alívio da dor decorrente (BROOM; FRASER, 2010). A preocupação com o controle da dor pode ser vantajosa para a própria produtividade, pois um animal com dor diminui, por exemplo, a ingestão de alimentos, o que resultará em menor produção de leite. Além disso, o alívio adequado da dor inflamatória estabelece uma condição de bem-estar geral do animal, com efeitos positivos sobre a velocidade e qualidade da recuperação (FITZPATRICK et al., 2013).

Muitos produtores e técnicos não incluem alívio da dor no tratamento de mastite e claudicação (LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012) e geralmente desconsideram as manifestações moderadas das doenças, como é o caso da mastite subclínica e claudicações de escore 2 e 3. A falta de habilidade em reconhecer sinais iniciais de dor faz com que produtores negligenciem o devido tratamento aos animais (O'CALLAGHAN et al., 2003; O'LEARY et al., 2020). Além disso, estudos já demonstraram que diversas condições patológicas resultam em estados hiperalgésicos, desde a inequívoca dor produzida pela descorna com ferro quente (ADCOCK, TUCKER, 2020) que pode produzir um aumento generalizado de longo prazo na sensibilidade à dor em bezerros (ADCOCK, TUCKER, 2018), até a claudicação crônica (HERZBERG et al., 2020) e mastite clínica e subclínica (GIOVANNINI et al., 2017), condições que podem resultar em diferentes graus de sensibilidade. Porém, GIOVANNINI et al., (2017) ressaltam que na presença de sintomas graves de doença sistêmica, como sonolência, letargia e depressão, é mais provável que se observe um aumento do que uma diminuição no limiar nociceptivo. Além disso, diferentes tipos de estresse (ansiedade, dor, medo) podem produzir tanto hipoalgesia quanto hiperalgesia (GAYNOR; MUIR, 2014), portanto, esse tema deve ser mais bem estudado em bovinos.

Dependendo da intensidade, mastite e claudicação podem ser extremamente dolorosas. De fato, dor associada com condições inflamatórias, como a mastite e a claudicação, são provavelmente as maiores fontes de dor em ruminantes (FITZPATRICK; SCOTT; NOLAN, 2006; GLEERUP et al., 2015; SHEARER et al., 2013). Apesar da dor geralmente fazer parte do quadro clínico, existe uma lacuna de conhecimento em relação à intensidade e os efeitos que a dor e o estresse causados por enfermidades podem provocar nos animais (FLOWER; WEARY, 2006). É esperado que essas enfermidades cursem com hiperalgesia primária, devido aos danos teciduais e inflamação local. Porém, uma hiperalgesia secundária pode se instalar para além do local lesionado, decorrente de uma sensibilização central (WOOLF, 2011). A sensibilização central é definida operacionalmente como uma amplificação da sinalização neural dentro do SNC que elicia hipersensibilidade à dor, ou seja, ocorre um aumento prolongado, mas reversível, na excitabilidade e eficácia sináptica de neurônios das vias nociceptivas centrais (WOOLF, 2011). Portanto, a sensibilização central pode resultar em cronificação da dor (ASHMAWI; FREIRE, 2016), ou seja, a dor crônica não é simplesmente uma dor aguda que dura por mais tempo, mas sim um processo patológico com mecanismos diferentes. Em vacas leiteiras já foi demonstrado que a inflamação crônica dolorosa do casco leva a um aumento acentuado na concentração de citocinas no corno dorsal da medula espinhal, o que pode representar um estado de neuroinflamação do SNC (HERZBERG et al., 2020).

Se a excitabilidade de neurônios nas vias de dor do SNC for aumentada, pode haver a ativação desses neurônios com estímulos inócuos de baixa intensidade. O resultado disso é uma maior capacidade de resposta (hiperalgesia e alodinia) a uma variedade de estímulos periféricos. Baseados nessas respostas foram desenvolvidos vários testes de limiar nociceptivos e os principais incluem estimulação mecânica, radiação por calor ou contato térmico (TADICH et al., 2013; MACHADO F; HURNIK; EWING, 1998; LOVE; MURRELL; WHAY, 2011).

Autores que estudaram as alterações comportamentais de vacas relacionadas a mastite (MEDRANO-GALARZA et al., 2012; PETERS; SILVEIRA; FISCHER, 2015) apresentam resultados e conclusões contraditórias em determinar se vacas com mastite ficam mais ou menos sensíveis ou resistentes em relação à nocicepção quando submetidas a um estímulo doloroso. Investigação feita por PETERS, SILVEIRA e FISCHER (2015) indica que vacas com mastite têm sua sensibilidade à dor aumentada, reduzindo seu limiar nociceptivo, fato também observado por FITZPATRICK et al. (1998). Já MEDRANO-GALARZA et al. (2012), ao estudarem vacas com mastite clínica moderada, encontraram alterações comportamentais comparando-as a vacas saudáveis, contudo, não estabeleceram relação com dor específica. Os diferentes resultados podem estar relacionados aos métodos de aferição da dor em animais, que

remetem à nocicepção, e apresentam variações em relação à fonte, forma de estímulo e equipamentos utilizados (DI GIMINIANI; PETERSEN; HERSKIN, 2014; LANGEMARK et al., 1989; MACHADO F; HURNIK; EWING, 1998; RAUNDAL et al., 2015; VEISSIER et al., 2000).

Alterações do limiar nociceptivo, como indicador de dor, podem explicar a ocorrência de comportamentos e de situações de estresse e sofrimento animal. Desta forma, estabelecer a relação de afecções comuns como a mastite e a claudicação com a dor e o estresse, pode colaborar na mudança de atitude de produtores de leite e profissionais das ciências agrárias frente à suas atuações em relação a prevenção e ao tratamento de enfermidades. O objetivo do presente estudo foi verificar se o limiar nociceptivo de vacas leiteiras é alterado na ocorrência de afecções comuns como a mastite e a claudicação.

### 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional do tipo caso-controle em um grupo populacional restrito e uma exposição transversal especial, na região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil (SHAMLIYAN et al., 2011; SHAMLIYAN; KANE; DICKINSON, 2010). O estudo foi realizado entre os meses janeiro e março de 2018, em 10 fazendas leiteiras com animais em sistema de confinamento (*Freestall* e *Compost Barn*). Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Protocolo nº CEUA nº 201712339) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

A amostra foi selecionada por conveniência (DOHOO; WAYNE; STRYHN, 2003) e o reporte do estudo está de acordo com a Declaração Veterinária STROBE para relatar estudos epidemiológicos observacionais (SARGEANT et al., 2016). Os produtores convidados a participar da pesquisa foram contatados por agentes de assistência técnica da área onde foi realizado o estudo. Os objetivos, métodos e procedimentos específicos foram explicados a todos os agricultores participantes e seu consentimento para o uso de seus animais na pesquisa foi obtido prévio à coleta dos dados. Os critérios de inclusão utilizados para o recrutamento de fazendas incluíram o seguinte: a) rebanho composto majoritariamente pela raça Holandês; b) possuir área de alimentação com possibilidade de contenção; c) disponibilidade e consentimento para participar do estudo; d) possuir rebanho entre 30 e 130 vacas em lactação; e) facilidade de acesso. Foram selecionados 10 estabelecimentos que se enquadraram nos critérios, distribuídas em 3 municípios da região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, onde

foram avaliadas 614 vacas em lactação. Os rebanhos possuíam em média 61,4 vacas em lactação (38-122) com uma produção diária média de 27,8 (25,0-32,0) L/vaca, com as vacas alojadas em regime de confinamento (*Compost barn* e *Freestall*) (Tabela 9).

### **6.3.1 Procedimentos experimentais**

As visitas nas UP's foram realizadas por uma equipe de 3 pesquisadores constituída de um especialista responsável pela avaliação da saúde do úbere, realização do teste de limiar nociceptivo e outro pela avaliação do escore de claudicação e pessoal de apoio. Todos os avaliadores passaram por uma etapa de treinamento e padronização de procedimentos. Vacas com outras condições clínicas que não fosse mastite ou claudicação e de outras raças que não a Holandês foram descartadas do estudo.

### **6.3.2 Verificação da saúde do úbere e diagnóstico de mastite**

Os procedimentos de diagnóstico de mastite foram todos realizados por um único pesquisador veterinário. As vacas lactantes foram identificadas individualmente pela numeração do brinco no momento da ordenha e foram examinadas. O úbere foi inspecionado visualmente na sala de ordenha e foram realizados diagnóstico de mastite clínica e subclínica e contagem de quartos mamários não funcionais por indivíduo (BRITO et al., 1997; RADOSTITS et al., 1994). Informações sobre a produção de leite por animal e rebanho, paridade e dias no leite de vaca foram coletadas dos registros dos produtores, quando disponíveis.

Os procedimentos de avaliação da saúde do úbere consistiram na inspeção do úbere, coleta e avaliação dos três primeiros jatos de leite para observar a aparência (odor, cor, presença ou ausência de grumos, sangue ou material estranho). A mastite clínica foi avaliada pela realização do teste da caneca de fundo falso. A mastite subclínica foi avaliada usando o reagente *California Mastitis Test* (CMT) e sua interpretação foi realizada da seguinte maneira: as amostras que reagiram foram consideradas positivas e classificadas em três níveis (1, 2 e 3) conforme a formação de gel; as amostras que não reagiram (CMT Negativo) foram consideradas negativas (RADOSTITS et al., 1994). Os resultados foram registrados em planilhas.

### **6.3.3 Avaliação do escore de claudicação**

Os animais foram observados em marcha, durante a saída da sala de ordenha, atribuindo-lhes um escore de claudicação de 1 a 5. Escore 1 foi estabelecido para as vacas com marcha perfeita; escore 2 foi atribuído às vacas que apresentavam sinais pouco evidentes de claudicação; escore 3 aos casos de claudicação moderada; escore 4 às vacas com claudicação severa e; escore 5 às vacas com claudicação severa e extrema dificuldade de locomoção, conforme metodologia descrita por (FLOWER; WEARY, 2006). A avaliação do escore de claudicação foi realizada por um profissional treinado.

### **6.3.4 Verificação do limiar térmico nociceptivo**

O limiar nociceptivo de todas as vacas em lactação foi avaliado por meio de estímulo térmico aplicado na região dorsal da falange média (Figura 3), com as vacas contidas no canzil na área de alimentação logo após a alimentação. Cada vaca era avaliada em estação e com liberdade para remover o membro avaliado quando desejasse. O aparelho era sempre posicionado na região dorsal da falange média do membro anterior esquerdo do animal; após acionado, o aparelho era aquecido gradualmente até que o animal levantasse o membro. Imediatamente o aparelho era desligado e a temperatura máxima era registrada por um termômetro com sonda de rápida resposta. Foram tomadas três medidas consecutivas, com intervalos suficientes para permitir o resfriamento do equipamento e a acomodação de cada animal testado. Testes com temperaturas inferiores a 50 graus centígrados foram desconsiderados, assim como os testes nos quais animais apresentavam sinais de inquietação; nesses casos, os procedimentos eram repetidos. Para garantir que o aparelho não causasse queimadura no tegumento das vacas, estabelecemos a temperatura de segurança de 90°C, temperatura próxima ao indicado por MACHADO F, HURNIK e EWING (1998). Esse trabalho utilizou vacas da mesma raça, porém saudáveis e sem aplicação de nenhum tratamento para fazer a validação da técnica (25°C acima da linha de base de 65°C, resposta encontrada). Nos casos em que esta temperatura foi atingida sem a retirada da pata pelo animal, o aparelho foi desligado e essa temperatura era registrada. A técnica, equipamento e metodologia utilizada neste estudo foram desenvolvidas e validadas por MACHADO F, HURNIK e EWING (1998).



Figura 3. Demonstração da aplicação do aparato para verificação do limiar nociceptivo através de estímulo térmico.

### 6.3.5 Organização e análise dos dados

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2017). Foram avaliadas a ocorrência de mastite e claudicação.

Os dados foram agrupados por rebanho e por estado de saúde. Os resultados foram categorizados e os seguintes grupos foram formados: a) não afetados pela mastite (CMT negativo e traços), nem claudicação (pontuação 1), livres de outra condição clínica; b) com mastite moderada (CMT 1 e 2); c) com mastite severa (CMT 3 e mastite clínica); d) com claudicação moderada (escore 3); e) com claudicação severa (escores 4 e 5). Os dados de vacas com mastite moderada (CMT 1 e 2) e claudicação moderada (pontuação 2 e 3) foram analisados separadamente. As informações sobre as variáveis consideradas nos modelos estatísticos, categorias e número de pontuações por nível são apresentadas na Tabela 9. As associações incondicionais entre pares de preditores e entre preditores e resultados foram avaliadas para identificar possíveis fatores de confundimento ou variáveis de interação e selecionar os preditores para construir as regressões multiníveis. Os preditores associados ao resultado na análise univariada (valor  $P < 0,2$ ) foram testados em modelos multivariados (DOHOO et al., 2003).

Foi realizada a descrição geral das variáveis com estatísticas descritivas (média, mediana, desvio padrão e número de observações), realizado os testes das variáveis preditores,



avaliado o confundimento ou interferência, variáveis dependentes, restituição variável por meio de testes univariados e multivariados, utilizando o Chi-quadrado tipo Wald II. As variáveis associadas a mastite e/ou claudicação foram incluídas na modelagem estatística.

Os dados foram inspecionados para corrigir erros de digitação, conferir dados perdidos, organizar a tabela e categorizar variáveis segundo a sua distribuição e significado biológico. A prevalência de mastite severa (clínica e subclínica CMT 3), mastite moderada (subclínica, CMT 1 e 2) e de quartos mamários afuncionais foi estimada para cada rebanho. A proporção de animais afetados por mastite severa e moderada e por quartos mamários afuncionais, de animais com claudicação moderada (escores 2 e 3) e severa (escores 4 e 5) foi usada como desfecho nos modelos estatísticos em nível individual (animais afetados) e de rebanho (prevalência). Foi utilizada estatística descritiva, tabelas de frequências e gráficos de distribuição para analisar cada variável. Foram elaborados testes de correlação (Pearson ou Spearman, segundo o tipo de variável analisada) entre cada uma das variáveis na base de dados. As seguintes observações foram censuradas nos três desfechos ao momento de elaborar os modelos: a) Vacas diagnosticadas com mastite em todos os quartos mamários foram censuradas para análises de mastite subclínica; b) Quartos mamários diagnosticados com mastite clínica foram censurados nas análises de mastite subclínica e vice-versa; c) Quartos mamários afuncionais foram censurados nas análises de mastite clínica e subclínica; d) Quartos mamários tratados com antibióticos ao momento da visita foram censurados; e) Dados sobre vacas primíparas até 9 dias após o parto e vacas múltíparas até 11 dias após o parto foram excluídos da análise (DOHOO et al., 2003). Para toda variável categórica foi calculada a proporção de animais afetados ou a prevalência por rebanho, filtrando por cada desfecho. Foram descartadas do estudo vacas de outras raças que não a Holandês ou que apresentavam algum dos itens restritivos descritos anteriormente.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Descrição da amostra

O total de vacas em lactação nos dez rebanhos avaliados foi de 614 vacas. Da população estudada, 501 (32-111) vacas atenderam todos os critérios estabelecidos. Os rebanhos possuíam em média 61 (38-122) vacas em ordenha. A produção média de leite diária por vaca, informada pelos produtores variou entre 25 a 32 litros, com uma produção de leite da ordem de 52.338 (29.640-117.120) L/mês por UP (Tabela 9).

Das 501 vacas avaliadas, 153 (30%) foram consideradas sem mastite, claudicação ou outras afecções clínicas. A prevalência da mastite nos dez rebanhos estudados foi de 39,3% para mastite subclínica e de 7% para mastite clínica, enquanto que para a categoria mastite severa (mastite subclínica CMT 3 e mastite clínica) foi de 22,8% (Tabela 9). A prevalência da claudicação clínica (escores <2) foi de 54% e da claudicação severa (escores 4 e 5) de 21,4% (Tabela 9).

Tabela 9. Descrição das Unidades de produção (n=10)

Item	Descrição
Início e fim da coleta de dados (mês e ano)	01/2018 – 03/2018
Vacas em lactação (n)	n=614 (38-122)
Vacas avaliadas (n)	n=501 (32-111)
Tipo de alojamento (n=10)	<i>Freestall</i> (6), <i>Compost barn</i> (4)
<i>Compost barn</i> (Nº vacas avaliadas, média, mínimo e máximo)	148; 37 (32-44)
<i>Freestall</i> (Nº vacas avaliadas, média, mínimo e máximo)	353; 58,8 (33-111)
Produção média de leite por rebanho (L/mês)	52.338 (29.640-117.120)
Produção estimada de leite (L/vaca/dia)	27,8 (25-32)
Número de ordenhas por dia	2 n=7; 3 n=3
Vacas não afetadas	138 (27,5%)
Vacas afetadas por mastite e/ou claudicação	363 (72,5%)
Vacas com mastite subclínica	197 (39,3%)
Vacas com mastite moderada (CMT 1 e 2)	100 (20%)
Vacas com mastite severa (CMT 3 e MC)	114 (22,8)
Vacas com mastite clínica	35 (7%)
Vacas detectadas com claudicação	275 (54,9%)
Vacas com claudicação moderada (escore 3)	168 (33,5%)
Vacas com claudicação severa (escore 4 e 5)	107 (21,4%)
Limiar térmico nociceptivo	75,11± 6,51(57,13-95,33)

A proporção de vacas afetadas por rebanho (n=10) variou entre 20 a 51%, 5 a 36% e 0 a 12% para mastite subclínica, severa e clínica, respectivamente; e entre 21 a 85% e 0 a 46% para claudicação clínica (escore >2) e severa (escores 4 e 5), respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Proporção de vacas afetadas por mastite subclínica (CMT 1, 2 e 3), mastite severa (CMT 3 e MC), mastite clínica, claudicação clínica (escores 3, 4 e 5) e claudicação severa (escores 4 e 5) em 10 rebanhos alojados em *Compost Barn* (n=4) ou *Freestall* (n=6).

UP	Alojamento	Mastite subclínica		Mastite severa		Mastite clínica		Claudicação clínica		Claudicação severa		Obs. n
		%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	
1	<i>Compost barn</i>	29,0	46,0	5,3	22,6	0,0	0,0	47,4	50,6	21,1	41,3	38
2	<i>Freestall</i>	19,6	40,1	13,0	34,1	8,7	28,5	82,6	38,3	39,1	49,3	46
3	<i>Freestall</i>	39,4	49,6	15,2	36,4	3,0	17,4	84,9	36,4	45,5	50,6	33
4	<i>Compost barn</i>	34,4	48,3	18,8	39,7	6,3	24,6	78,1	42,0	37,5	49,2	32
5	<i>Compost barn</i>	41,2	50,0	23,5	43,1	11,8	32,7	20,6	41,0	0,0	0,0	34
6	<i>Freestall</i>	33,3	47,9	15,2	36,4	3,0	17,4	66,7	47,9	24,2	43,5	33
7	<i>Compost barn</i>	40,9	49,7	18,2	39,0	0,0	0,0	54,6	50,4	18,2	39,0	44
8	<i>Freestall</i>	48,0	50,3	35,6	48,2	9,6	29,7	27,4	44,9	8,2	27,7	73
9	<i>Freestall</i>	33,3	47,6	26,3	44,4	10,5	31,0	50,9	50,4	12,3	33,1	57
10	<i>Freestall</i>	50,5	50,2	29,7	45,9	9,0	28,8	57,7	49,6	22,5	42,0	111

Vacas sem mastite e sem claudicação (n=144) reagiram à menor temperatura (74,1°C) no teste do limiar térmico nociceptivo. A temperatura de reação apresentou uma tendência de aumento nas vacas afetadas por uma ou ambas afecções e em relação a sua severidade (Tabela 11).

Tabela 11. Limiar térmico nociceptivo de vacas leiteiras, conforme sua condição em relação a mastite e claudicação.

Claudicação	Mastite	Média	Desvio Padrão	Observações
Não afetada	Não afetada	74,1	7,0	144
Não afetada	Moderada	76,5	6,2	37
Não afetada	Severa	76,2	5,5	45
Moderada	Não afetada	74,2	5,7	91
Moderada	Moderada	74,2	5,9	42
Moderada	Severa	76,0	5,4	35
Severa	Não afetada	75,1	7,6	52
Severa	Moderada	76,8	6,7	21
Severa	Severa	76,4	7,2	34

A prevalência média de mastite clínica e de CMT 3 foi mais alta no sistema *freestall* do que no *compost barn* (Tabela 12) e observa-se uma distribuição diferente nos dois sistemas (Figura 4). Apesar de não encontrarmos diferença na prevalência média de claudicação severa (escores 4 e 5), também houve uma distribuição diferente nos dois sistemas (Figura 5).

Figura 4. Prevalência da mastite (CMT 3 e mastite clínica) em 501 vacas avaliadas, agrupadas por rebanhos alojados em *Freestall* (n=6) e *Compost barn* (n=4).

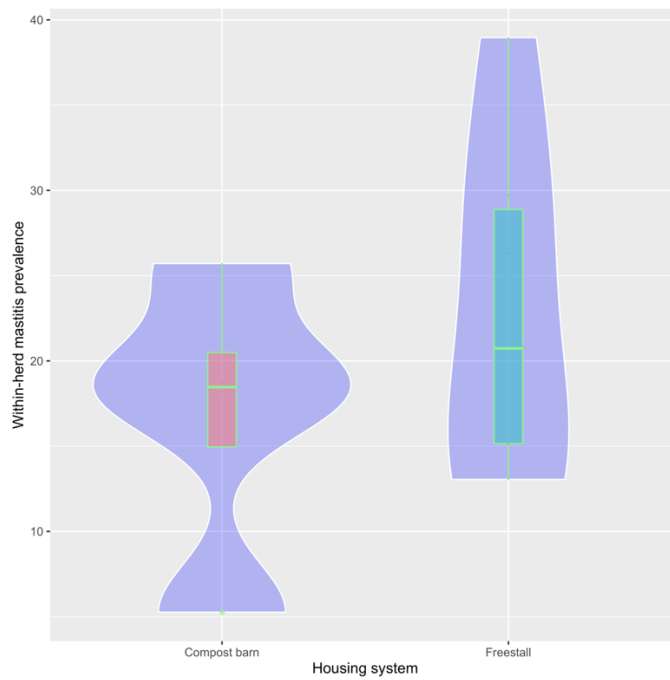
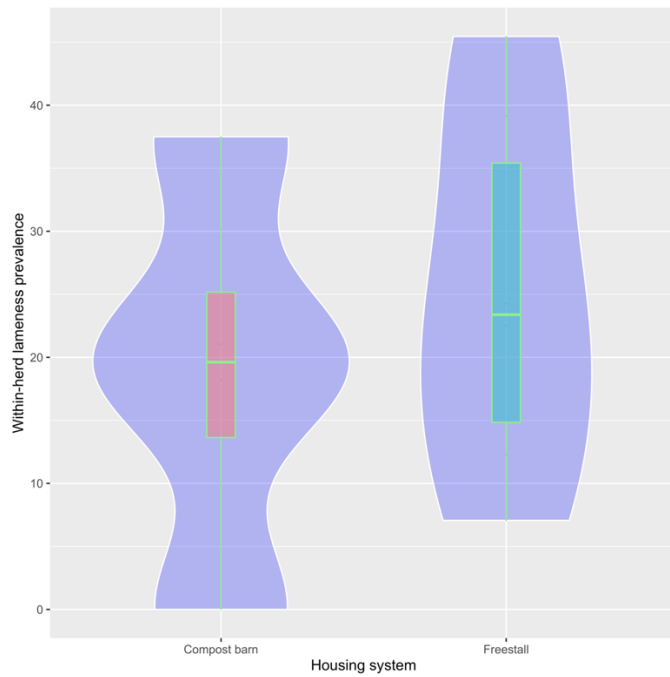


Figura 5. Prevalência da claudicação severa (escores 4 e 5) em 501 vacas avaliadas agrupadas por rebanhos alojados em *Freestall* (n=6) e *Compost barn* (n=4).



Foi estimada uma prevalência de 45,9% de vacas sem claudicação clínica (Tabela 12). A prevalência da claudicação clínica (EC 3, 4 e 5) foi estimada em 54,1% (n=501) enquanto da claudicação severa (EC 4 e 5) em 20,8% (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição das vacas avaliadas conforme o escore de claudicação (EC).

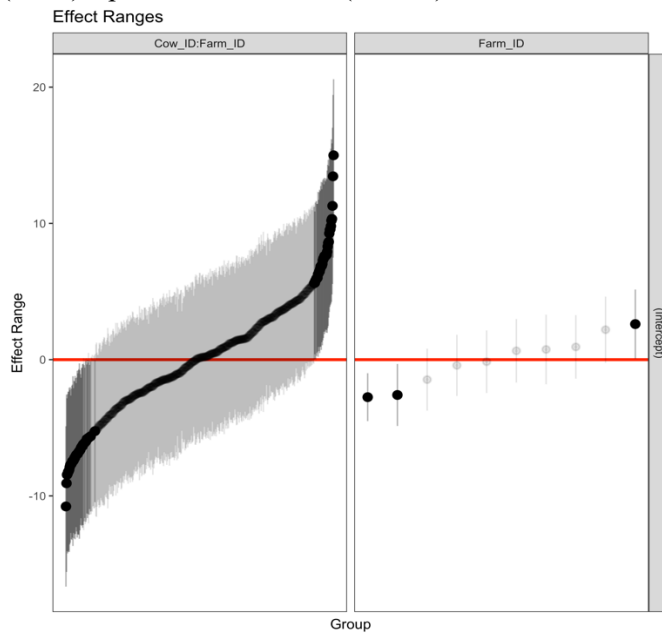
EC	n	Proporção
1	38	7,6
2	188	37,5
3	168	33,5
4	95	18,9
5	12	2,4

O limiar térmico nociceptivo de vacas lactantes não afetadas por mastite, claudicação ou outras afecções clínicas foi utilizado como referência em modelo linear misto com os rebanhos como efeito aleatório para considerar a estrutura agrupada dos dados. Vacas com mastite severa (CMT 3 e mastite clínica, n= 116) responderam aos estímulos térmicos a temperaturas mais elevadas (1,58 ICr 0,27 a 3,01°C,) do que as vacas sem mastite (n= 290, 74,45 ICr 72,44 a 75,65°C). Verificou-se que 38% da variação não explicada pode ser atribuída às vacas e 6% aos rebanhos (Figura 6). Vacas com mastite severa apresentaram limiar superior de dor (P=0,03). Nas vacas com claudicação moderada, apesar do limiar numericamente superior ao das vacas com mastite, não foi observada diferença significativa (Tabela 12).

Tabela 13. Prevalência média da mastite e claudicação severas conforme o tipo de alojamento.

Alojamento	Claudicação severa				Mastite severa			
	Média	DP	n	EP	Média	DP	n	EP
<i>Compost barn</i>	18,8	39,2	149	3,2	21,9	41,6	114	3,9
<i>Freestall</i>	21,6	41,2	365	2,2	31,3	46,4	291	2,7

Figura 6. Variação do efeito aleatório por grupo (n=10) e por vaca observada (n= 501).



Observou-se uma variação na resposta dos animais avaliados entre os testes de nociceção realizados, com uma tendência de redução da temperatura de resposta do primeiro para os demais testes com médias de 78,4; 74,4 e 72,2°C, nos testes 1, 2 e 3 respectivamente. Optamos por incluir esta variável no modelo final (Tabela 14). As respostas dos testes de nociceção apresentaram uma tendência de aumento do limiar relacionada ao aumento da severidade das afecções. Vacas livres de afecções responderam a temperatura média de 74,1°C, com claudicação moderada a 74,3°C e com claudicação severa a 75,9°C, com mastite moderada a 75,5°C e com mastite severa a 75,7°C. Vacas com claudicação severa (1,6 ICr 0,2-3,1), mastite moderada (1,5 ICr 0,1-2,9) e severa (1,6 ICr 0,2-3,0) reagiram a temperaturas superiores ( $P < 0,05$ ) das vacas não afetadas (Tabela 14).

Tabela 14. Modelo final: Limiar térmico nociceptivo de vacas leiteiras da raça Holandês (n=501), livres de mastite e claudicação (não afetadas), com claudicação severa e mastite moderada e severa, em 10 rebanhos.

Variáveis	Categorias	Coefficiente	ICr <sup>1</sup> 95%
Não afetadas	(Intercepto)	77,5	76,1-79,0
Claudicação	Severa (4-5) <sup>4</sup>	1,6	0,2-3,1
Mastite	Moderada <sup>4</sup>	1,5	0,1-2,9
	Severa <sup>4</sup>	1,6	0,2-3,0
Segunda medida		-4,0	-4,7- -3,4
Terceira medida		-6,2	-6,8- -5,5
	Variância	DP <sup>2</sup>	ICC <sup>3</sup>
1503 grupos	4,0	2,0	48%
501 vacas (10 rebanhos)	28,5	5,3	6%
Resíduos	26,8	5,2	

<sup>1</sup> Intervalo de credibilidade 95%

<sup>2</sup> Desvio padrão

<sup>3</sup> Coeficiente de Correlação Intraclasse computado usando a abordagem de variável latente.

<sup>4</sup> Valor de P<0,05

## 6.5 DISCUSSÃO

O resultado surpreendente desta pesquisa foi que vacas acometidas pelas afecções investigadas apresentaram o limiar térmico nociceptivo aumentado. Esse aumento de limiar foi observado inclusive em vacas com mastite subclínica, fato ainda não relatado na literatura. Pelo conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos dessas doenças (que cursam com lesão tecidual e liberação de substâncias inflamatórias e alogênicas) esperávamos encontrar hiperalgesia nas vacas acometidas severamente. Também porque utilizamos o mesmo aparelho com o qual PETERS, SILVEIRA e FISCHER (2015) encontraram uma diminuição linear do limiar térmico conforme aumentou a contagem de células somáticas (CCS), inclusive apresentando uma queda acentuada no limiar quando a CCS excedeu 640 mil/mL. Então, aprofundaremos a discussão sobre fatores que podem ter levado a esses resultados contraditórios com a literatura.

Uma das dificuldades de se avaliar dor em bovinos reside na característica, frequentemente descrita como estóica, deles não demonstrarem dor óbvia, demonstrando sinais somente em condição extremamente dolorosa (GLEERUP et al., 2015). Esse comportamento é próprio de espécies que são consideradas presas, mais do que predadoras. Todavia, se na

natureza essa característica tem utilidade biológica<sup>5</sup> na sobrevivência dessas espécies, no ambiente industrial de produção animal a dissimulação de dor somente os prejudica e, por muitos anos, a condição de sofrimento não lhes foi reconhecida. Somente na última década pesquisas com diferentes espécies-presa tem descoberto comportamentos sutis, como expressões faciais, como bons preditores de dor (DALLA COSTA et al., 2014; LANGFORD et al., 2010; SOTOCINAL et al., 2011). Em 2015 uma escala de dor por expressões faciais foi sugerida por (GLEERUP et al., 2015) para bovinos. Tais pesquisas sustentam o fornecimento de tratamento aos animais tanto nas expressões óbvias de dor, mas também nas sutis, e mais pesquisas devem ser feitas para descobrir outros comportamentos sutis e preditores. Lembrando que quanto mais cedo se reconhecer a dor e se intervir no processo que a causa, maior é a chance de sucesso no tratamento (GLEERUP, 2017). Além disso, uma dor não tratada pode se tornar crônica e aumentar em magnitude e, inclusive, o animal pode passar a perceber estímulos táteis como dolorosos, característicos de hiperalgesia e alodinia.

A hiperalgesia e alodinia são mediadas centralmente e não periféricamente, por isso, a dor crônica produzida por claudicação deve ser entendida como uma doença do Sistema nervoso central (SNC) que vai além da inflamação do casco (HERZBERG et al., 2019). Tal premissa deve valer para a mastite, pela sua tendência a produzir doença crônica dolorosa. Porém, a interpretação das mudanças fisiológicas e comportamentais dos bovinos em termos da experiência individual de dor está longe de ser direta. Por exemplo, o estresse e o manejo do rebanho podem ser os principais fatores de confusão na avaliação da dor (HERZBERG et al., 2019). Portanto, apesar dos testes de sensibilidade térmica e mecânica serem métodos validados há bastante tempo em diferentes espécies (GOZALO-MARCILLA et al., 2020; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), os testes podem ser prejudicados a campo. Estressores ambientais ou mesmo a diminuição na reatividade associada ao comportamento estoico, já mencionado anteriormente, podem resultar em confundimentos. De fato, HERZBERG et al. (2019) sugerem que a capacidade de resposta ao teste nociceptivo mecânico a diferentes intensidades de dor pode ser limitada.

Dessa forma, (KEMP et al., 2008), encontraram um resultado interessante ao avaliar o limiar nociceptivo mecânico de vacas com mastite. Eles perceberam que, em comparação com os animais de controle, o limiar foi mais alto (hipoalgesia) na perna do lado não afetado em vez de mais baixo (hiperalgesia) na perna do lado afetado. Nenhum outro estudo relatou tal

---

<sup>5</sup> Comportamentos que tem alto valor adaptativo para o indivíduo e função de sobrevivência para a espécie geralmente são transmitidos geneticamente e se mantém, apesar da seleção artificial ocorrida após a domesticação dessas mesmas.



fenômeno e esses autores descartaram a possibilidade de que estressores agudos estariam causando essa hipoalgesia, porque os animais controle estavam sob as mesmas condições experimentais. Portanto, uma explicação sugerida por eles foi que talvez a maior capacidade das vacas mastíticas de suportar a estimulação mecânica por mais tempo do que os animais de controle, fosse devido a uma relutância em mover ou deslocar seu peso para a perna no lado afetado. HERSKIN, MUNKSGAARD e LADEWIG (2004), encontraram sinais de hipoalgesia no teste nociceptivo térmico em vacas submetidas a todos os estressores agudos (isolamento social por 15 minutos, fixação da cabeça no canzil e vizinhos novos de baia), mas não nos grupos controle. No nosso trabalho também tínhamos grupo controle, que eram as vacas saudáveis, portanto, nossos resultados não são explicados por vieses relacionados a estressores ambientais, e sim pelo fato da condição da doença em si estar agindo como estresse agudo e levar a hipoalgesia nas vacas doentes.

Outra pesquisa mostrou que, durante o estágio agudo da mastite causada por infecção experimental com *E. coli*, a estimulação térmica nociceptiva na pata traseira e nas glândulas mamárias resultou em respostas comportamentais diminuídas, o que foi interpretado como hipoalgesia (RASMUSSEN et al., 2011). Entretanto, nesse mesmo estudo, medidas em dias posteriores foram reduzindo o tempo de reação, que podem ser devidos ao aprendizado associativo, sensibilização ou hiperalgesia devido à inflamação da glândula mamária. GAYNOR e MUIR (2014), ressaltam que dores severas, clinicamente agudas, são consideradas capazes de produzir temporariamente perda de sensações, enquanto condições dolorosas crônicas, geralmente aumentam a sensibilidade à dor. RASMUSSEN et al. (2011) argumentam que resultados divergentes são devidos também às modalidades de estímulo escolhidas, tipo de bactéria envolvida e estágio, evolução ou gravidade da doença são desconhecidos. No método adotado por eles, por exemplo, o estímulo térmico foi direcionado diretamente ao úbere com mastite e não às patas, como é feito em outros estudos.

Nós acrescentamos ainda outros fatores como a alta variabilidade de respostas individuais das vacas. Outros estudos que compararam a sensibilidade em diferentes partes do corpo puderam verificar respostas diferentes no mesmo indivíduo (KEMP et al., 2008; RIALLAND et al., 2014). A alta prevalência de claudicação clínica observada nos rebanhos pode ter reduzido o número de observações de controle, prejudicando a modelagem estatística (COSTA et al., 2018). No presente estudo não realizamos medidas em diferentes partes do corpo, mas houve variação significativa entre as 3 medidas aferidas no mesmo local de cada animal, com uma tendência de redução de limiar entre elas. O nosso estudo também não permite concluir se as respostas diminuídas foram devido à hipoalgesia ou uma reatividade diminuída

generalizada, já que outros testes não dolorosos não foram aplicados. Entretanto, essa variação pode estar relacionada por nossa opção em reduzir o tempo de intervalo entre os testes preconizado por MACHADO F, HURNIK e EWING (1998) para que não tivéssemos influência de outras variáveis. Mas argumentamos que a própria condição de dor pode ter atuado como um potente estresse agudo, havendo liberação de analgésicos endógenos no momento do teste e, então, nosso resultado seria decorrente de analgesia induzida por estresse (SIA), condição já bem documentada em animais (BAKER; VÁSQUEZ; MINAHAN, 2019; BUTLER; FINN, 2009; THOMSON et al., 2020) e humanos (GIRDLER et al., 2005). Em mamíferos de modo geral, a presença de estresse agudo precedendo um evento doloroso pode ter um efeito analgésico, enquanto a presença de estresse crônico pode resultar em hiperalgesia (THOMSON et al., 2020). O fato de realizarmos os testes na área de alimentação após a ordenha, fazendo com que as vacas que estavam com processos dolorosos se deslocassem para essa área, pode ter ativado os sistemas inibitórios intrínsecos da dor por estressores nocivos, o que é considerada resposta adaptativa durante a resposta de luta ou fuga. Dessa forma, é possível que mesmo vacas em processo de dor crônica, gerada por mastite e claudicação, poderiam desenvolver SIA.

## 6.6 CONCLUSÕES

O bem-estar animal é comprometido, principalmente pela alta prevalência de mastite e claudicação severas que acometem as vacas em lactação. A mastite e/ou a claudicação, quando severas, aumentam o limiar de dor em vacas leiteiras. Entretanto, as causas de tal aumento não foram evidentes. Maiores estudos são necessários para elucidar os fatores e mecanismos envolvidos nas respostas de dor e estresse, agudos e crônicos, que parecem interagir nos testes de limiar nociceptivo em bovinos em condições de rotina nas fazendas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os resultados dessa tese demonstraram fatores de risco comuns aos diferentes sistemas produtivos, uma preocupante multirresistência bacteriana em todos os sistemas produtivos e maior risco ao bem-estar animal nos sistemas em confinamentos, quando usado o indicador ocorrência de mastite e claudicação. Algumas considerações finais, limitações do trabalho e sugestões de trabalhos futuros são sumarizadas a seguir:

- Nesse trabalho a importância da mastite na produção leiteira ficou evidente, devido a sua alta ocorrência, comprometimento do bem-estar animal e falta de estratégias para seu controle e monitoramento. Devido à maior prevalência dessa doença em sistemas mais intensivos do que a pasto, sugerimos que o investimento em tecnologias para melhoramento de produção e qualidade de leite em sistemas a base de pasto sejam mais eficientes a médio e longo prazo para Unidades de Produção Familiar.

- Pesquisas utilizando métodos moleculares devem ser incluídas em estudos futuros, direcionadas ao conhecimento de bactérias comensais e patogênicas do úbere, a fim de se compreender melhor a dinâmica das interações, os nichos ambientais, base genética e mecanismos de transmissão de resistência antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite.

- Mais estudos devem ser direcionados entre os produtores intensivos sobre estratégias e alternativas à terapia de vaca seca, já que seu uso poderá ser mais restritivo em sistemas orgânicos e de baixo uso de antimicrobianos.

- A recente aderência do Brasil às iniciativas globais sobre monitoramento de resistência antimicrobiana pressupõem, entre outras estratégias, desenvolver vigilância e sistema de monitoramento do uso de antimicrobianos no âmbito da agropecuária. Portanto, sugere-se que políticas públicas voltadas para ações locais de identificação de resistência e monitoramento de uso de antibióticos sejam implementadas em rebanhos leiteiros.

- Melhorias no estudo da dor envolvida em doenças de animais de fazenda podem ser feitas conciliando-se medidas comportamentais com marcadores de lesão tecidual, como proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias. Porém, as pesquisas devem ser acompanhadas de ampla capacitação dos produtores na identificação de sinais sutis de dor e fornecimento de analgesia aos animais.

- Sugere-se que seja implementado nos diferentes sistemas produtivos um programa de avaliação de bem-estar animal mais amplo, que considere as condições de saúde, ambiente e comportamento, com padrões mínimos e ideais de qualidade a serem seguidos.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140085–20140085, 2015. doi:10.1098/rstb.2014.0085.

ADAMS, A. E. et al. Associations between housing and management practices and the prevalence of lameness, hock lesions, and thin cows on US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 2119–2136, 2017.

ADCOCK, S. J. J.; TUCKER, C. B. Conditioned place preference reveals ongoing pain in calves 3 weeks after disbudding. *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 1–9, 2020. DOI 10.1038/s41598-020-60260-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60260-7>.

ADCOCK, S. J. J.; TUCKER, C. B. The effect of disbudding age on healing and pain sensitivity in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 11, p. 10361–10373, 2018. DOI 10.3168/jds.2018-14987. Available at: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-14987>.

ÅKERFELDT, M. P. et al. Health and welfare in organic livestock production systems—a systematic mapping of current knowledge. *Organic Agriculture*, n. Eu 2018, 2020.

ANVISA, Brasil, 2009. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVET)**. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/pamvet-monitoramento-de-residuos-em-leite-exposto-ao-consumo-relatorio-2006-2007.pdf> (accessed 10 December 2020).

ARMBRECHT, L. et al. Assessment of welfare indicators in dairy farms offering pasture at differing levels. *Animal*, 2019.

ASHMAWI, H. A.; FREIRE, J. M. G. Sensibilização periférica e central. *Rev. Dor*, v. 17, supl.1, São Paulo, 2016. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160044>

BACIADONNA, L., et al. Looking on the Bright Side of Livestock Emotions—the Potential of Their Transmission to Promote Positive Welfare. *Front. Vet. Sci.*, v. 12, Set/ 2018.

BAKER, B. I., MACHIN, K. L., & SCHWEAN-LARDNER, K. When pain and stress interact: looking at stress-induced analgesia and hyperalgesia in birds. *World's Poultry Science Journal*, 75(3), 457-468, 2019.

BAKER, T. A.; VÁSQUEZ, E.; MINAHAN, J. A. Variability of Pain Outcomes and Physical Activity Among a Diverse Sample of Older Men: Is It More Than Just Race? **Gerontology and Geriatric Medicine**, v. 5, p. 233372141987858, 2019.

BALCÃO, L.F., LONGO, C., COSTA, J.H.C., ULLER-GÓMEZ, C., FILHO, L.C.P.M., HÖTZEL, M.J., 2017. Characterisation of smallholding dairy farms in southern Brazil. **Anim. Prod. Sci.**, 57 (4), 735. <https://doi:10.1071/an15133>.

BANGAR, Y. C. et al. A systematic review and meta-analysis of prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 2, p. 291–297, 2014.

BARKEMA, H. W. et al. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7426–7445, 2015.

BARKER, Z. E. et al. Assessment of lameness prevalence and associated risk factors in dairy herds in England and Wales. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 932–941, 2010.

BAŞTAN, A. et al. Investigation of the incidence and diagnosis of subclinical mastitis in early lactation period cows. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 119–121, 2008.

BATES, D. et al. **Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4**. n. 1, 2015.

BECKER, K., et al. The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans, **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 33-38, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.013>.

BEGEMANN, S. et al. How Political Cultures Produce Different Antibiotic Policies in Agriculture: A Historical Comparative Case Study between the United Kingdom and Sweden. **Sociologia Ruralis**, v. 58, n. 4, p. 765–785, 2018.

BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSSEN, E., & LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, 42(1), 2017. doi:10.1093/femsre/fux053

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. (2a edição). [s.l: s.n.]. v. 53, 2010.

BOIREAU, C., CAZEAU, G., JARRIGE, N., CALAVAS, D., MADEC, J.-Y., LEBLOND, A., ... GAY, É. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. **Journal of Dairy Science**. 2018. doi:10.3168/jds.2018-

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

BRAN, J. A. et al. Factors associated with lameness prevalence in lactating cows housed in freestall and compost-bedded pack dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 172, n. August, p. 104773, 2019.

BRAN, J. A. et al. Lameness on Brazilian pasture based dairies—part 1: Farmers' awareness and actions. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 157, n. June, p. 134–141, 2018.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. D. S.; PAIVA E BRITO, M. A. V. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 17, no. 2, p. 49–53, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000200002>.

BROOM, D.; FRASER, A. F. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. Ed. Manole ed. São Paulo: [s.n.].2010.

BROUCEK, J. et al. Effect of relocation and sire lineage on behaviour and milk yield of dairy cows. **Archives Animal Breeding**, v. 56, n. 1, p. 208–215, 2013.

BUSANELLO, M. et al. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545–6553, 2017.

BUTLER, R. K.; FINN, D. P. . Stress-induced analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 88, p. 184–202, 2009.

CANDIOTTO, L. et al. Milk quality in small farms from southern region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, n. 10, p. 1–5, 2020.

CARDOZO, L. L. et al. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. **Journal of Dairy Science** Vol. 98 No. 11, p. 7675–7685, 2015.

CASSOLI, L. Qualidade do Leite: Da 51 a 62. Onde Estamos Para Onde Vamos? Revista Leite Integral - **Técnica da Bovinocultura do Leite**. Piracicaba, ano 6, n. 36, p. 40 – 45, Fev-2012.

CLAY, N.; GARNETT, T.; LORIMER, J. Dairy intensification: Drivers, impacts and alternatives. **Ambio**, 2019.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, 2019.

COLLINS, S., et al. Evaluating the concept of iceberg indicators for on-farm welfare assessment of dairy cattle by farmers, **Cattle Practice**, v. 23, p. 300-301, 2015.

COMPTON, C. W. R. et al. Risk factors for peripartum mastitis in pasture-grazed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4171–4180, 2007.

COOK, N. B. Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 9, p. 1324–1328, 2003.

COOK, N. B., et al. Management characteristics, lameness, and body injuries of dairy cattle housed in high-performance dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p.5879-5891, jul/2016. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2016-10956>

COSTA, J. H. C. et al. A survey of management practices that influence production and welfare of dairy cattle on family farms in southern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 307–317, jan. 2013.

COSTA, J. H. C. et al. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2395–2405, 2018.

CUNY, C., WIELER, L., WITTE, W.. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans. **Antibiotics**. 4 (4), 521–543, 2015. <https://doi:10.3390/antibiotics4040521>.

CUNY, C.; FRIEDRICH, A.W.; WITTE, W. Absence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex CC398 as a nasal colonizer of pigs raised in an alternative system. **Appl. Environ. Microbiol.**78, 1296–1297, 2012. doi:10.1128/AEM.07260-11

DA CUNHA, A. F. et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 48–54, 2016.

DALLA COSTA, E. et al. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2014.

DANTZER, R.; BLUTHÉ, R.-M.; TAZ, A. I. Stress-induced analgesia in pigs. **Annales de Recherches Vétérinaires**, INRA Editions, v. 17, n. 2, p.147-151, 1986.

DANZINGER, N.; BARS, D. LE; BOUHASSIRA, D. Diffuse noxious inhibitory controls and arthritis in the rat. In: **Pain and Neuroimmune Interactions**. Ed: NayefE. Saade et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 69 – 70, 2000.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DE JONG, A. et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **Veterinary Microbiology**, v. 213, n. October 2017, p. 73–81, 2018.



DE VISSCHER A, PIEPERS S, HAESBROUCK F, SUPRÉ K, DE VliegHER S. Coagulase negative Staphylococcus species in bulk milk: prevalence, distribution, and associated subgroup- and species-specific risk factors. **Journal of Dairy Science** 100(1):629–642, 2017. DOI 10.3168/jds.2016-11476.

DEFANTE, L. et al. Typology of dairy production systems that meet Brazilian standards for milk quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, p. 2009–2016, 2019.

DESANTANA, J. M. et al. Definição de dor revisada após quatro décadas. **BrJP**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 197-198, Set/ 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20200191>

DEVRIES, T. J. et al. Associations of dairy cow behavior, barn hygiene, cow hygiene, and risk of elevated somatic cell count. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 10, p. 5730–9, 2012.

DI GIMINIANI, P.; PETERSEN, L. J.; HERSKIN, M. S. Characterization of nociceptive behavioural responses in the awake pig following UV-B-induced inflammation. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 1, p. 20–28, jan. 2014.

DOERFLER, R. L. et al. Impact of robot scrapers on clinical mastitis and somatic cell count in lactating cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 467–470, 2018.

DOHOO, I. R.; WAYNE, M.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. Charlottetown, Prince Edward Island - Canada: [s.n.]. 2003.

DUFOUR, S. et al. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 563–579, 2011.

DURST, P. **Double-dipping teats?** 2012. Disponível em: [https://www.canr.msu.edu/news/double-dipping\\_teats](https://www.canr.msu.edu/news/double-dipping_teats).

ECKELKAMP, E. A. et al. Sand bedded freestall and compost bedded pack effects on cow hygiene, locomotion, and mastitis indicators. **Livestock Science**, v. 190, p. 48–57, 2016.

FEINGOLD, B. J., SILBERGELD, E. K., CURRIERO, F. C., VAN CLEEF, B. A. G. L., HECK, M. E. O. C., KLUYTMANS, J. A. J. W. Livestock-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Humans, the Netherlands. **Emerg. Infect. Dis.** 18(11), 1841–1849, 2012. <http://doi:10.3201/eid1811.111850>

FERNÁNDEZ, A. et al. Impacts of Compost Bedded Pack Barns on the Welfare and Comfort of Dairy Cows. **Animals** 2020, 10, 431; doi:10.3390/ani10030431

FIRTH, C. L. et al. Relationship between the probability of veterinary-diagnosed bovine mastitis occurring and farm management risk factors on small dairy farms in Austria. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4452–4463, 2019.

FITZPATRICK, C. E.; CHAPINAL, N.; PETERSSON-WOLFE, C. S.; DEVRIES, T. J.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, vol. 96, no. 5, p. 2847–2856, 2013. DOI 10.3168/jds.2012-5855. Available at: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5855>.

FITZPATRICK, J. L., et al. Recognizing and controlling pain and inflammation in mastitis. UK. **Proceedings British Mastitis Conference 1998**, Axient/Institute for Animal Health, Milk Development Council/Novartis Animal Health, 1998, p. 36-44.

FITZPATRICK, J.; SCOTT, M.; NOLAN, A. Assessment of pain and welfare in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 62, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 55–61, 2006.

FLOWER, F. C.; WEARY, D. M. Effect of Hoof Pathologies on Subjective Assessments of Dairy Cow Gait. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 139–146, 2006.

FONTANELI, R. S. et al. Performance of lactating dairy cows managed on pasture-based or in freestall barn-feeding systems. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 1264–1276, 2005.

FRASER, D. Understanding animal welfare. **Acta Vet Scand**, v. 50, S1, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-S1-S1>

FREITAS, M.F.L., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., STAMFORD, T.L.M., RABELO, S.S. DE A., DA SILVA, D.R., DA SILVEIRA FILHO, V.M., SANTOS, F.G.B., DE SENA, M.J., MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de staphylococcus coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.** 72 (2): 171-177, 2005.

FREY, Y., RODRIGUEZ, J. P., THOMANN, A., SCHWENDENER, S., & PERRETEN, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, 96(4), 2247, 2013. doi:10.3168/jds.2012-6091

FULWIDER, W. K. et al. Survey of Dairy Management Practices on One Hundred Thirteen North Central and Northeastern United States Dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1686–1692, 2008.

GAYNOR, James S.; MUIR, William W. **Handbook of Veterinary Pain Management-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2014.

GELMAN, A. et al. arm: Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models, **R package** version 1.10-1. p. 1–53, 2018.

GIOVANNINI, A. E. J.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; WALL, S. K.; WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M.; SPADAVECCHIA, C. Experimentally induced subclinical mastitis: Are lipopolysaccharide and lipoteichoic acid eliciting similar pain responses? **Acta Veterinaria Scandinavica**, vol. 59, no. 1, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0306-z>.

GIRDLER, S. S. et al. Cigarette smoking, stress-induced analgesia and pain perception in men and women. **Pain**, v. 114, n. 3, p. 372–385, 2005.

GLEERUP, K. B. et al. Pain evaluation in dairy cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 25–32, 2015.

GLEERUP, K. B. Identifying Pain Behaviors in Dairy Cattle Functions and Effects of **Pain**. v. 29, n. March, p. 231–239, 2017.

GONÇALVES, J. L. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, n. January, p. 25–32, 2018a.

GONÇALVES, J. L. et al. Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4357–4366, 2018b.

GOZALO-MARCILLA, M. et al. Thermal, mechanical and electrical stimuli in antinociceptive studies in standing horses: an update. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 47, n. 1, p. 15–27, 1 jan. 2020.

GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUIJKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **Int. J. Med. Microbiol.** 301, 630–634, 2011. DOI:10.1016/j.ijmm.2011.09.004

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HANSMANN, V. K. ; VOLLING, O. ; & KRÖMKER, V. Udder health in organic dairy herds in Northern Germany. **Milk Science International**, n. Table 1, p. 16–24, 2019.

HARTIG, F. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. **R package** version 0.2.0. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>, 2018.

HARTWIGER, J. et al. Effects of a change from an indoor-based total mixed ration to a rotational pasture system combined with a moderate concentrate feed supply on immunological cell and blood parameters of dairy cows. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, 2019.

HASSANZADEH, S., GANJLOO, S., POURMAND, M.R., MASHHADI, R., GHAZVINI, K., 2020. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microb. Pathog.** <https://doi:10.1016/j.micpath.2019.103850>.

HEINS, B. J. et al. Effects of winter housing systems on production, economics, body weight, body condition score, and bedding cultures for organic dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 706–714, 2019.

HERMANS, L. et al., An Overview of Offset Analgesia and the Comparison with Conditioned Pain Modulation: A Systematic Literature Review. **Pain Physician**, v. 19, p. 307–326, 2016. <https://www.painphysicianjournal.com/linkout?issn=&vol=19&page=307>

HERSKIN, M. S.; MUNKSGAARD, L.; LADEWIG, J. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. **Physiology and Behavior**, v. 83, n. 3, p. 411–420, 2004.

HERZBERG, D. et al. Spinal reactive oxygen species and oxidative damage mediate chronic pain in lame dairy cows. **Animals**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2019.

HERZBERG, D., et al. Chronic Inflammatory Lameness Increases Cytokine Concentration in the Spinal Cord of Dairy Cows. **Front. Vet. Sci.**, v. 28, Feb/ 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00125>

HILLERTON, E.; BOOTH, J. M. The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial! **NMC Annual Meeting Proceedings**, n. February, p. 3–17, 2018.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, v. 28, n. 2, p. 217–224, 2012.

HONORATO, L.A., et al. Strategies used by dairy family farmers in the south of Brazil to comply with organic regulations. **J Dairy Sci**, v. 97, p. 1319–1327, 2014.

HOUSE, H. K.; ANDERSON, N. G. Maximizing Comfort in Tiestall Housing Tiestall Cow comfort Tie rail Stall partition Electric trainer. *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*, v. 35, n. 1, p. 77–91, 2019.

HUGHES, D. 2014. Selection and evolution of resistance to antimicrobial drugs. **IUBMB Life**, 66(8), 521–529. doi:10.1002/iub.1278

HUND, A. et al. Aspects of lameness in pasture based dairy systems. **Veterinary Journal**, v. 244, p. 83–90, 2019.

International Dairy Federation. IDF Animal Health Report. Issue N° 11 - September 2017. **Research progress Global insights** Expert opinion. <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2017/09/IDF-AHN-N11.pdf>.

IMBE, H.; IWAI-LIAO, Y.; SENBA, E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2179-2192, 2006.

IRAMIOT, J. S. et al. Antimicrobial resistance at the human–animal interface in the Pastoralist Communities of Kasese District, South Western Uganda. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

JAGIELSKI, T.; BAKUŁA, Z.; DI MAURO, S.; CASCIARI, C.; CAMBIOTTI, V.; KRUKOWSKI, H.; TURCHETTI, B.; RICCHI, M.; MANUALI, E.; BUZZINI, P. A comparative study of the in vitro activity of iodopropynyl butylcarbamate and amphotericin B against *Prototheca* spp. isolates from European dairy herds. **Journal of Dairy Science**, (),2017 S0022030217306653–. doi:10.3168/jds.2017-12597

JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, p. 1–18, 2018.

JENKINS S.N., OKELLO E., ROSSITTO P.V., LEHENBAUER T.W., CHAMPAGNE J., PENEDO M.C.T., ARRUDA A.G., GODDEN S., RAPNICKI P., GORDEN P.J., TIMMS L.L., Aly S.S. Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. **PeerJ** 7:e6749, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6749>

JONES, G. M. Guidelines to Culling Cows with Mastitis. **Virginia Cooperative Extension** 404-204, p. 1–3, 2009.

JÓŻWIK, A.; et al. Relations between the oxidative status, mastitis, milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows—A review. **Anim. Sci. Pap. Rep.** 2012, 30, 297–307.

KALMUS, P. et al. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 1–7, 2011.

KALUPAHANA, R. S., DUIM, B., VERSTAPPEN, K. M., GAMAGE, C. D., DISSANAYAKE, N., RANATUNGA, L., ... WAGENAAR, J. A. MRSA in Pigs and the Environment as a Risk for Employees in Pig-Dense Areas of Sri Lanka. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 3, 2019. doi:10.3389/fsufs.2019.00025

KAPPES, R. et al. Cow's functional traits and physiological status and their relation with milk yield and milk quality in a compost bedded pack barn system. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, 2020.

KEMP, M. H. et al. Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. **Veterinary Record**, v. 163, n. 6, p. 175–179, 2008.

KIESNER, K. et al. Selection of cows for treatment at dry-off on organic dairy farms. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 4, p. 468–475, 2016.

KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. April 2017, p. 166–185, 2018.

KORNER-NIEVERGELT, F. et al. Bayesian Data Analysis in Ecology Using Linear Models with R, **BUGS, and Stan**. [s.l: s.n.]. 2015.

KRISTULA, M. A. et al. Evaluation of free-stall mattress bedding treatments to reduce mastitis bacterial growth. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1885–1892, 2008.

KUHNEN, S. STIBUSKI, R.B., HONORATO, L.A., MACHADO FILHO, L.C.P., Farm Management in Organic and Conventional Dairy Production Systems Based on Pasture in Southern Brazil and Its Consequences on Production and Milk Quality. **Animals**. 5(3): 479–494, 2015. [https://doi: 10.3390/ani5030367](https://doi.org/10.3390/ani5030367).

LAM, Y. C.; CRAWFORD, J. M. Discovering antibiotics from the global microbiome. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 392–393, 2018.

LANGEMARK, M. et al. Pressure pain thresholds and thermal nociceptive thresholds in chronic tension-type headache. **Pain**, v. 38, n. 2, p. 203–210, 1989.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, 2010.

LANGONI, H., SALINA, A., OLIVEIRA, G. C., JUNQUEIRA, N. B., MENOZZI, B. D., JOAQUIM, S. F. 2017. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37(11), 1261–1269. doi:10.1590/s0100-736x2017001100011

LAXMINARAYAN, R., DUSE, A., WATTAL, C., ZAIDI, A. K. M., WERTHEIM, H. F. L., SUMPRADIT, N., ... CARS, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, 13(12), 1057–1098, 2013. doi:10.1016/s1473-

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597 LP – 652, 1 dez. 2001.

LEES, P. et al. A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n. July, p. 1–35, 2020.

LESLIE, K. E.; PETERSSON-WOLFE, C. S. Assessment and Management of Pain in Dairy Cows with Clinical Mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 289–305, 2012.

LESO, L. et al. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1072–1099, 2020.

LEVISON, L. J. et al. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science** Vol. 99 No. 2, p. 1341–1350, 2016.

LINDEMAN, C. J. et al. Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002-2010. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 5, p. 581–591, 2013.

LOCKWOOD, S. M.; BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. An investigation into the noradrenergic and serotonergic contributions of diffuse noxious inhibitory controls in a monoiodoacetate model of osteoarthritis. **J Neurophysiol**, v. 121, p. 96 –104, 2018; doi:10.1152/jn.00613.2018.

LOO, E., SONG LAI, K., & MANSOR, R. Antimicrobial Usage and Resistance in Dairy Cattle Production. **Veterinary Medicine and Pharmaceuticals**, 2019. doi:10.5772/intechopen.81365

LOPEZ-BENAVIDES, M. G. et al. Field observations on the variation of streptococcus uberis populations in a pasture-based dairy farm. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5558–5566, 2007.

LOVE, E. J.; MURRELL, J.; WHAY, H. R. Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 38, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2011.

LOW et al, **Cambridge Declaration On Consciousness**. 2012. Disponível em: <http://fcmconference.org/img/CambridgeDeclarationOnConsciousness.pdf>

MACHADO F, L. C. P.; HURNIK, J. F.; EWING, K. K. A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 218–223, 1998.

MACHADO, L. C. P. 2010. **Pastoreio Racional Voisin**: tecnologia agroecológica para o terceiro milênio. Expressão Popular, 2 Edição, São Paulo. 376p.

MACLENNAN, A. J.; JACKSON, R. L.; MAIER, S. F. Conditioned analgesia in the rat. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v.15, n. 6, p. 387-390, 1980.

MAGNUSSON, U. Prudent and effective antimicrobial use in a diverse livestock and consumer's world. **Journal of animal science**, v. 98, n. April, p. 2016–2020, 2020.

MANYI-LOH, C., MAMPHWELI, S., MEYER, E., & OKOH, A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, 23(4), 795. doi:10.3390/molecules23040795

MAPA, 2011. Instrução Normativa MAPA no 46 de 06/10/2011. <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view>

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.

MARTINS, R. P. et al. Prevalência E Etiologia Infecçiosa Da Mastite Bovina Na Microrregião De Cuiabá-Mt. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181–187, 2010.

MARTUCCI, K. T.; YELLE, M. D., COGHILL, R. C. Differential Effects of Experimental Central Sensitization on the Time-course and Magnitude of Offset Analgesia. **Pain**, v. 153, n. 2, p. 463–472, 2012. doi:10.1016/j.pain.2011.11.010

MATAR, G. M.; ANDREMONT, A.; BAZZI, W. Editorial: Combating Antimicrobial Resistance - A One Health Approach. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. January, p. 10–13, 2020.

MCDUGALL, S. et al. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 177–185, 2009.

MEDRANO-GALARZA, C. et al. Behavioral changes in dairy cows with mastitis. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 12, p. 6994–7002, 2012.

MEE, JF & BOYLE, LA. Assessing whether dairy cow welfare is “better” in pasture-based than in confinement-based management systems, **New Zealand Veterinary Journal**, 68:3, 168-177, 2020. DOI: 10.1080/00480169.2020.1721034

MENDONÇA, E. C. L. et al. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859–864, 2012.

MISCHKOWSKI, D., et al. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses - corrected and republished. **Pain**, v. 160, n 6, p. 1469-1481, 2019. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001573.

MONISTERO, V., GRABER, H., POLLERA, C., CREMONESI, P., et al. *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. **Toxins**. 10, 247, 2018. [https://doi: 10.3390/toxins10060247](https://doi.org/10.3390/toxins10060247).

MOTA, V. C. et al. Confinamento para bovinos leiteiros: histórico e características. **Pubvet**, v. 11, n. 5, p. 433–442, 2017.



NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003.

NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P. REVIEW: How well have United States dairy producers adopted mastitis-control technologies for reducing herd somatic cell counts improving milk quality? **Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2, p. 115–124, 2014.

O'LEARY, N.W. et al. Grazing Cow Behavior's Association with Mild and Moderate Lameness. **Animals**, v. 10, n. 4, 661, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10040661>

O'CALLAGHAN, et al., Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. **Animal welfare**, v. 12, n.4, p.605-610, out/2003.

OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, 97(9), 5426–5436, 2014. doi:10.3168/jds.2013-7756

OLIVEIRA, V. C. et al. Compost-bedded pack barns in the state of Minas Gerais : architectural and technological characterization. **Agronomy Research** 17(5), 2016–2028, 2019 <https://doi.org/10.15159/AR.19.179>

ÓZSVÁRI, L. Economic Cost of Lameness in Dairy Cattle Herds. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, vol. 6, no. 2, p. 283–289, 2017. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.06.00176>.

PAHARIK, A. E., SCHREIBER, H. L., SPAULDING, C. N., DODSON, K. W., & HULTGREN, S. J. 2017. Narrowing the spectrum: the new frontier of precision antimicrobials. **Genome Medicine**, 9(1). doi:10.1186/s13073-017-0504-3

PANTOJA, J. C. F. et al. Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1843–1855, 2020.

PEREIRA-SILVA et al., Attenuation of the Diffuse Noxious Inhibitory Controls in Chronic Joint Inflammatory Pain Is Accompanied by Anxiodepressive-Like Behaviors and Impairment of the Descending Noradrenergic Modulation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21(8), p. 2973, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21082973>

PERTOVAARA , A. et al. Ischemic pain non-segmentally produces a predominant reduction of pain and thermal sensitivity in man - a selective role for endogenous opioids. **Brain Res.**, v. 251, p. 83 – 92, 1982.

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

PETZER, I. M. et al. Validity of somatic cell count as indicator of pathogen-specific intramammary infections. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 88, n. 1, p. 1–10, 2017.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1873–1892, 2011.

PIROLO, M., et al. Unidirectional animal-to-human transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pig farming; evidence from a surveillance study in southern Italy. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 8, n. 187, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0650-z>

PIZAURO, L. J. L., DE ALMEIDA, C. C., SOLTES, G. A., SLAVIC, D., DE ÁVILA, F. A., ZAFALON, L. F., & MACINNES, J. I. Short communication: Detection of antibiotic resistance, *mecA*, and virulence genes in coagulase-negative *Staphylococcus* spp. from buffalo milk and the milking environment. **Journal of Dairy Science**, 2019. doi:10.3168/jds.2018-15920

POIZAT, A. et al. Antibiotic use by farmers to control mastitis as influenced by health advice and dairy farming systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, n. July, p. 61–72, 2017.

POL, M.; RUEGG, P.L. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, 90(1), 0–273. 2007 doi:10.3168/jds.s0022-0302(07)72627-9

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C., 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed Editora, Porto Alegre.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Viena: **R Foundation for Statistical Computing**, 2017. <http://www.R-project.org/>. (Accessed 25 agosto 2020).

RABELLO, R. F., BONELLI, R. R., PENNA, B. A., ALBUQUERQUE, J. P., SOUZA, R. M., & CERQUEIRA, A. M. F. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, 10(4), 552, 2020. doi:10.3390/ani10040552

RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. **Herd Health – Food Animal Production Medicine**. Saunders. Philadelphia, 1994.

RAMÍREZ, N. F. et al. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4141–4150, 2014.

RASMUSSEN, D. B. et al. Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 32, 2011.

RAUNDAL, P. M. et al. Pre-test habituation improves the reliability of a handheld test of mechanical nociceptive threshold in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 189–195, out. 2015.

REINERT, A.; TREEDE, R.-D., BROMM, B. The pain inhibiting pain effect: an electrophysiological study in humans, **Brain Research**, v. 862, n 1–2, p. 103-110, 2000.

RHUDY, J.L. Chapter 3 - Emotional Modulation of Pain. In: **Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion: Psychological and Clinical Implications**. Ed. Mustafa al'Absi and Magne Arve Flaten. Elsevier B.V, p. 51-75, 2016.

RIALLAND, P. et al. Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomized, and controlled study focusing on spinal pain proteomics. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2118–2134, 2014.

RICE, E. W., WANG, P., SMITH, A. L., & STADLER, L. B. Determining Hosts of Antibiotic Resistance Genes: A Review of Methodological Advances. **Environmental Science & Technology Letters**. 2020. doi:10.1021/acs.estlett.0c00202

RIESENFELD, C. S., GOODMAN, R. M., & HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, 6(9), 981–989. 2004.

RODRIGUEZ, A. R., et al. Plasma concentration of norepinephrine,  $\beta$ -endorphin, and substance P in lame dairy cows, **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 193-197, 2018. doi: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0029>

ROESCH, M. et al. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 86–92, 2007.

ROSSI, B. F. et al. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, n. November 2018, p. 45–50, 2019.

ROTHMAN KJ, GREENLAND S, LASH TL. **Modern Epidemiology**. 3rd ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SANSEVERINO, I. et al. 2019. State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance, EUR 29592 EN, **Publications Office of the European Union**, Luxembourg, doi:10.2760/771124, JRC114775.

SANTIAGO-NETO, WALDEMIR; MACHADO, GUSTAVO; PAIM, DANIEL S.; DE CAMPOS, THAIS; BRITO, MARIA A.V.P.; CARDOSO, MARISA R.I.; CORBELLINI, LUÍS G. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras**, 34 (7), 2014.

SANTOS, M. V. Mastite bovina e o uso de antibióticos. Jun-Jul/13. **Mundo do Leite**. São Paulo-SP, v. 61, p. 18 - 20, 2013.

SARGEANT, J. M. et al. Methods and processes of developing the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology – veterinary ( STROBE-Vet ) statement &. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 134, p. 188–196, 2016.

SATO, K; et al. A comparison of production and management between Wisconsin organic and conventional dairy herds. **Livestock Production Science**, v. 93, p. 105–115, 2005.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Associat.** 130, 199-204, 1957.

SCHERPENZEEL, C. G. M. et al. Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage, and economics. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3753–3764, 2016.

SCHOENFELDER, S. M. K., DONG, Y., FEBLER, A. T., SCHWARZ, S., SCHOEN, C., KÖCK, R., ZIEBUHR, W. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. **Vet. Microbiol.** 200, 79–87. 2017. <https://doi:10.1016/j.vetmic.2016.04.019>.

SCHULZ, J; BOKLUND, A; TOFT, N; HALASA, T. Drivers for Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Spread Among Danish Pig Herds - A Simulation Study. **Scientific Reports**, 8(1), 16962, 2018. doi:10.1038/s41598-018-34951-1

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A. P., GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Vet. Microbiol.** 141(1-2), 1–4, 2010. <https://doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.013>.

SHAMLIYAN, T. A.; KANE, R. L.; ANSARI, M. T.; RAMAN, G.; BERKMAN, N. D.; GRANT, M.; JANES, G.; MAGLIONE, M.; MOHER, D.; NASSER, M.; ROBINSON, K. A.; SEGAL, J. B.; TSOUROS, S. Development quality criteria to evaluate nontherapeutic studies of incidence, prevalence, or risk factors of chronic diseases: Pilot study of new checklists. **Journal of Clinical Epidemiology**, vol. 64, no. 6, p. 637–657, 2011. DOI 10.1016/j.jclinepi.2010.08.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.08.006>.

SHAMLIYAN, T.; KANE, R. L.; DICKINSON, S. A systematic review of tools used to assess the quality of observational studies that examine incidence or prevalence and risk factors for diseases. **Journal of Clinical Epidemiology**, vol. 63, no. 10, p. 1061–1070, 2010. DOI 10.1016/j.jclinepi.2010.04.014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.04.014>.

SHEARER, J. K. et al. Assessment and Management of Pain Associated with Lameness in Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 1, p. 135–156, 2013.

SHENKER, N.G., et al. Contralateral hyperalgesia and allodynia following intradermal capsaicin injection in man. **Rheumatology** (Oxford), v. 47, n. 9, p. 1417–212008. doi: 10.1093/rheumatology/ken251.

SINGER, R.S. et al. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet*. **Infectious Diseases**, v. 3, Jan/ 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00490-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00490-0)

SO, ANTHONY D.; SHAH, TEJEN A.; ROACH, STEVEN; CHEE, YOKE LING; NACHMAN, KEEVE E. 2015. An Integrated Systems Approach is Needed to Ensure the Sustainability of Antibiotic Effectiveness for Both Humans and Animals. **Journal of law, medicine & ethics /antibiotic resistance**. 38 – 45.

SOARES, F. S. et al. Antibiotic-induced pathobiont dissemination accelerates mortality in severe experimental pancreatitis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, 2017.

SORGE, R., et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. **Nat Methods**, v. 11, p. 629–632, 2014. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935>

SOTOCINAL, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 55, 2011.

SOUZA, F. N. DE; MARIA, M.; PINHO, O. Prevalence, etiology and risk factors of subclinical mastitis in dairy cattle of Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 160–166, 2015.

SULEIMAN, T. S.; KARIMURIBO, E. D.; MDEGELA, R. H. Prevalence of bovine subclinical mastitis and antibiotic susceptibility patterns of major mastitis pathogens isolated in Unguja island of Zanzibar, Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 2, p. 259–266, 2018.

SUNDQVIST, M. 2014. Reversibility of antibiotic resistance. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 119(2), 142–148.. doi:10.3109/03009734.2014.903323

TADICH, N. et al. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 401-405, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.029>.

TANG, K. L., CAFFREY, N. P., NÓBREGA, D. B., CORK, S. C., RONKSLEY, P. E., BARKEMA, H. W., POLACHEK, A.J., GANSHORN, H., SHARMA, N., KELLNER, J.D., GHALI, W. A. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet. Health*. 1(8), e316– e327, 2017. [https://doi:10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi:10.1016/S2542-5196(17)30141-9).

TANGCHAROENSATHIEN, V.; CHANVATIK, S.; SOMMANUSTWEECHAI, A. Complex determinants of inappropriate use of antibiotics. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 2, p. 141–144, 2018.

TANSLEY, et al. Conditioned pain modulation in rodents can feature hyperalgesia or hypoalgesia depending on test stimulus intensity. **Pain**, v. 160, n. 4, p. 784-792, 2019. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001454. PMID: 30681982.

TAPONEN, S. et al. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 493–503, 2017.

THOMAS, V. et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 1, p. 13–20, 2015.

THOMPSON, A. J.; WEARY, D. M.; BRAN, J. A.; DAROS, R. R.; HÖTZEL, M. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Lameness and lying behavior in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 102, no. 7, p. 6373–6382, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15717>.

THOMSON, J. S. et al. Acute and chronic stress prevents responses to pain in zebrafish: evidence for stress-induced analgesia. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 14, 2020.

TIAN, X.Y., ZHENG, N., HAN, R.W., HO, H., WANG, J., WANG, Y.T., WANG, S.Q., LI, H.G., LIU, H.W., YU, Z.N. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Streptococcus* isolated from dairy cows with mastitis in China. **Microb. Pathog.**, 2019. [https://doi:10.1016/j.micpath.2019.03.035](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.035).

TIKOFISKY, L. L., BARLOW, J. W., SANTISTEBAN, C., SCHUKKEN, Y.H. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. **Microb. Drug Resist.** 9(Suppl. 1):S39–S45, 2003. [https://doi:10.1089/107662903322541883](https://doi.org/10.1089/107662903322541883).

TISEO, K. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2020.

TIWARI, J. G. et al. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of Bovine Mastitis: An overview. **Journal of Vaccines and Vaccination**, v. 4, n. 2, 2013.

TOLOSA, T. et al. Pathogen group specific risk factors for clinical mastitis, intramammary infection and blind quarters at the herd, cow and quarter level in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 120, n. 3–4, p. 306–312, 2015.

TOMAZI, T.; DOS SANTOS, M. V. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, n. February, p. 104937, 2020.

TÓTH, A.G., CSABAI, I., KRIKÓ, E. Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. **Sci Rep**, 10, 7464, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>

USDA. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH) **National Animal Health Monitoring System (NAHMS)**, Fort Collins, CO2016. Dairy 2014, Milk quality, milking procedures and mastitis in the United States, 2014.

VAN BOECKEL, PIRES, J., SILVESTER, R., ZHAO, C., SONG, J., CRISCUOLO, N.G., GILBERT, M., BONHOEFFER, S., LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*. 365, 6459, 2019. [https://doi: 10.1126/science.aaw1944](https://doi.org/10.1126/science.aaw1944).

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN DE VIJVER, L. P. L., TULINSKI, P., BONDT, N., MEVIUS, D., & VERWER, C. Prevalence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Organic Pig Herds in The Netherlands. **Zoonoses and Public Health**, 61(5), 338–345, 2014. doi:10.1111/zph.12076

VANCE, E. R. et al. Food intake, milk production, and tissue changes of Holstein-Friesian and Jersey × Holstein-Friesian dairy cows within a medium-input grazing system and a high-input total confinement system. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1527–1544, 2012.

VANDERHAEGHEN, W., PIEPERS, S., LEROY, F., VAN COILLIE, E., HAESEBROUCK, F., AND DE VLIEGHER, S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health **J. Dairy Sci.** 97(9), 5275–5293, 2014. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7775>.

VEISSIER, I. et al. A laser-based method for measuring thermal nociception of cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 66, n. 4, p. 289–304, 2000.

VITTINGHOFF E. **Statistics for biology and health**. New York: Springer; Regression methods in biostatistics: linear, logistic, survival, and repeated measures models. 2005.

VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., AND WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. **Emerging Infect. Dis.** 11(12), 1965–1966, 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050428>

WASHBURN, S. P. et al. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved holstein and jersey cows in confinement or pasture systems. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 105–111, 2002.

WATTIAUX, M. A. **Mastite: A doença e sua transmissão**. Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira 45 Internacional. University of Wisconsin – Madison: Babcock Institute, p 89-92, 2014.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. 2014. <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (accessed 13 December 2020).

WHO. World Health Organization. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. 5th revision Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) October 2016. <https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf?ua=1%20%20>.



WIECH, K.; TRACEY, I. The influence of negative emotions on pain: Behavioral effects and neural mechanisms. **NeuroImage**, v. 47, p. 987–994, 2009. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.05.059

WIERUP, M. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 183–190, 2001.

WINDER, C. B. et al. Comparative efficacy of teat sealants given prepartum for prevention of intramammary infections and clinical mastitis: A systematic review and network meta-analysis. **Animal Health Research Reviews**, v. 20, n. 2, p. 182–198, 2019.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. 2011; 152 Suppl 3: S2–15. doi:10.1016/j.pain.2010.09.030

XIAO, K.-Q., LI, B., MA, L., BAO, P., ZHOU, X., ZHANG, T., ZHU, Y.-G. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes in paddy soils from South China. **FEMS Microbiol. Ecol.** 92 (3), fiw023, 2016. <https://doi:10.1093/femsec/fiw023> doi:10.1093/femsec/fiw023.

**9 ANEXOS**

Data subset

Model

# Factors associated with subclinical mastitis in dairy cows in Santa Catarina State, Brazil: models

## Farm type and subclinical mastitis - Poisson model

2020/12/02

```
library(car)
#library(ggbiplot)
library(lme4)
library(lattice)
library(tidyverse)
library(doBy)
library(performance)
library(nlme)
library(Amelia)
library(blme)
library(blme)
library(reshape2)
library(merTools)
library(DHARMA)
library(arm)
library(sjPlot)
library(merTools)
```

```
Hm <- read_csv("../data/herd/Herd_level_dec_02_2020.csv")
```

```
## Warning: Missing column names filled in: 'X1' [1]
```

```
##
## — Column specification —————
##
## cols(
##   .default = col_double(),
##   `Management system` = col_character(),
##   Visit = col_character(),
##   Municipality = col_character(),
##   Farmer = col_character(),
##   `Management system2` = col_character(),
##   Researcher = col_character(),
##   `Milking time` = col_character(),
##   `Milking parlour` = col_character(),
##   `Milking parlour walls` = col_character(),
##   `In-parlour feeder` = col_character(),
##   `Holding area floor` = col_character(),
##   `Feed cows while milking` = col_character(),
##   `Pre-dipping solution` = col_character(),
##   `Post-dipping solution` = col_character(),
##   `Milk flow system` = col_character(),
##   `Milking interval hours` = col_character(),
##   `Type of milking parlour floor` = col_character(),
##   `Milking parlour floor cleanliness` = col_character(),
##   `Milking parlour floor surface` = col_character(),
##   `Post-milking area floor cleanliness` = col_character()
## ) # ... with 9 more columns
## i Use `spec()` for the full column specifications.
```

## Data subset

The data were summarized by farm type and town

```
farm_ty <- Hm %>%
  group_by(
    Town,
    Farms
  ) %>%
  summarise(
    `Affected.sc` = sum(`Affected cows scm`),
    `Total cows` = sum(`Lactating herd size`),
    `Affected clin` = sum(`Affected cows cm`),
    `Affected bq` = sum(`Affected cows bq`)
  ) %>%
  mutate(Farms = factor(Farms))
```

```
## `summarise()` has grouped output by 'Town'. You can
## override using the `.groups` argument.
```

```
farm_ty
```

<b>Town</b> <chr>	<b>Farms</b> <fct>	<b>Affected.sc</b> <dbl>
Coronel Martins	Grazing agroecological	18
Coronel Martins	Grazing high input	30
Coronel Martins	Grazing low input	23
Formosa do Sul	Grazing agroecological	12
Formosa do Sul	Grazing high input	13
Formosa do Sul	Grazing low input	6
Jupia	Grazing agroecological	7
Jupia	Grazing high input	30
Jupia	Grazing low input	9
Other	Confined	181

1-10 of 19 rows Previous **1** 2 Next

Farms were categorized by type:

- Confined (compost barn and freestall)
- Grazing
  - Agroecological
  - Low-input
  - High-input

Using “high-input” grazing farms as the reference category

```
contrasts(farm_ty$Farms) <- contr.Treatment(levels(farm_ty$Farms), base = 2)
```

## Model

```
summary(  
  fmln <- glmer(Affected.sc ~ 1 + (1|Town),  
                data = farm_ty,  
                family = "poisson",  
                offset = log(`Total cows`))  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: Affected.sc ~ 1 + (1 | Town)
## Data: farm_ty
## Offset: log(`Total cows`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    168.8      170.7     -82.4    164.8        17
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.6959 -1.1646 -0.1665  0.5496  5.3577
##
## Random effects:
##  Groups Name          Variance Std.Dev.
##  Town   (Intercept) 0.01771  0.1331
## Number of obs: 19, groups: Town, 6
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.21687    0.07184  -16.94  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1

```

```

summary(
  fml <- glmer(Affected.sc ~ Farms + (1|Town),
              data = farm_ty,
              family = "poisson",
              offset = log(`Total cows`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: Affected.sc ~ Farms + (1 | Town)
## Data: farm_ty
## Offset: log(`Total cows`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 129.5 134.2 -59.7 119.5 14
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.0912 -0.6585 0.2202 0.4726 2.1363
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Town (Intercept) 0.02584 0.1607
## Number of obs: 19, groups: Town, 6
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error
z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.39316 0.10789
-12.913 < 2e-16 ***
## Farms[T.Grazing agroecological] 0.09752 0.13185
0.740 0.460
## Farms[T.Grazing low input] -0.11567 0.12336
-0.938 0.348
## Farms[T.Confined] 0.60096 0.11637
5.164 2.41e-07 ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) F[T.Ga F[T.li
## Frms[T.Gag] -0.523
## Frms[T.Gli] -0.483 0.392
## Frms[T.Cnf] -0.590 0.553 0.456

```

```
Anova(fml)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
Farms	43.88167	3	1.599105e-09
1 row			

Simulating the model (2000 times)

```
sim.fm1 <- sim(fm1, n.sim = 2000)
```

The function “sim” from arm package (Gelman and Su, 2018) was used to draw 2000 random values from the joint posterior distribution of the model (Korner-Nievergelt, et al, 2015).

The Credible Interval (95%) for fixed effects was extracted from the simulated values.

Source:

Korner-Nievergelt, Franzi, et al. Bayesian Data Analysis in Ecology Using Linear Models with R, Bugs, and Stan. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015.

Arm citation:

Andrew Gelman and Yu-Sung Su (2018). arm: Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models. R package version 1.10-1. <https://CRAN.R-project.org/package=arm> (<https://CRAN.R-project.org/package=arm>)

Simulated parameters from model:

From the simulated values, the 2.5% and 97.5% quantiles can be used for the 95% credible interval.

Coefficients in log scale:

```
CrI <- round(apply(sim.fm1@fixef, 2, quantile, prob = c  
(0.025, 0.5, 0.975)), 2)  
CrI
```

```
##          (Intercept) Farms[T.Grazing agroecological] Fa  
rms[T.Grazing low input]  
## 2.5%          -1.61                               -0.16  
-0.35  
## 50%           -1.39                               0.10  
-0.12  
## 97.5%        -1.18                               0.34  
0.12  
##          Farms[T.Confined]  
## 2.5%           0.37  
## 50%            0.60  
## 97.5%          0.83
```

Associations between subclinical mastitis and farm type:

The predicted proportion of cows affected by subclinical mastitis (logarithm scale) was superior in confined dairy farms (0.6 95% CrI 0.38 to 0.82) compared with grazing high-input farms.

The proportion of cows affected by subclinical mastitis was similar between all the grazing farm types.



Incidence rate ratio (exponentiated coefficients):

```
exp(CrI)
```

```
##      (Intercept) Farms[T.Grazing agroecological] Fa
rms[T.Grazing low input]
## 2.5%    0.1998876                                0.8521438
0.7046881
## 50%     0.2490753                                1.1051709
0.8869204
## 97.5%   0.3072787                                1.4049476
1.1274969
##      Farms[T.Confined]
## 2.5%           1.447735
## 50%           1.822119
## 97.5%         2.293319
```

The rate ratio of subclinical mastitis was 1.8 (95% CrI 1.5 to 2.3) times greater in confined farms compared with low-input grazing farms.

Goodness of fit

Checking overdispersion:

```
dispersion_glmmer(fm1)
```

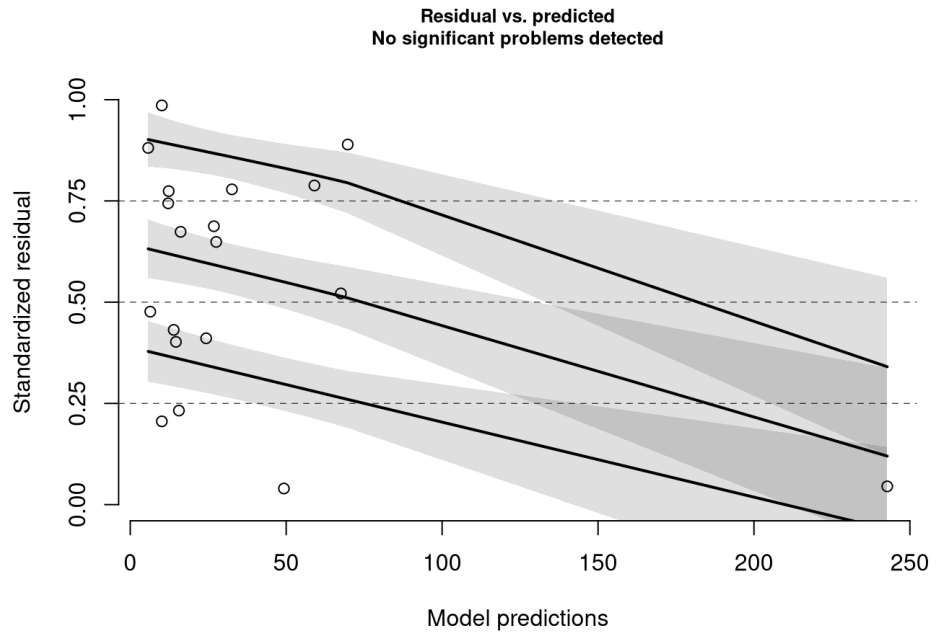
```
## [1] 0.9444186
```

Simulating residuals:

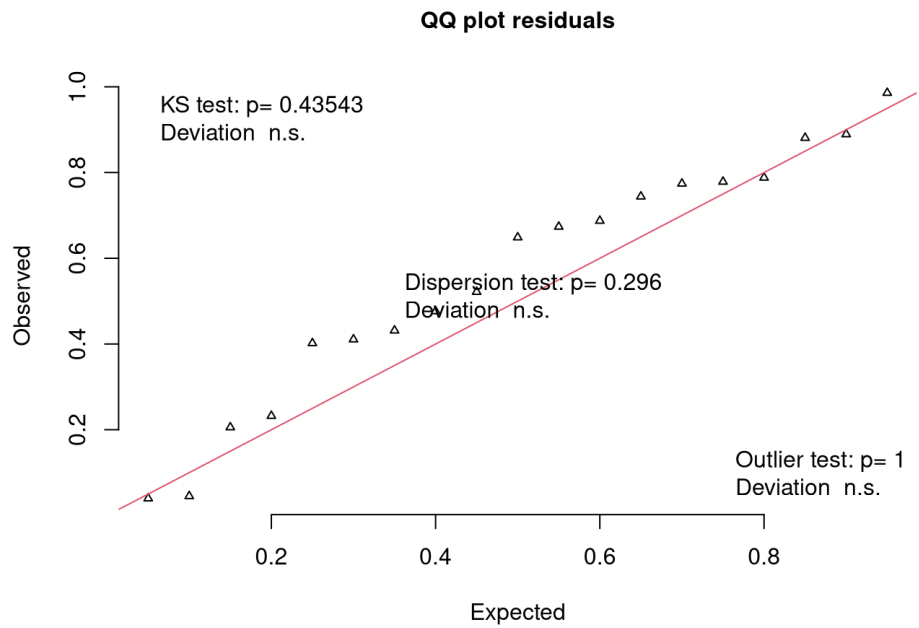
```
srfm1 <- simulateResiduals(fm1)
```

Plotting simulated residuals:

```
plotResiduals(srfm1)
```



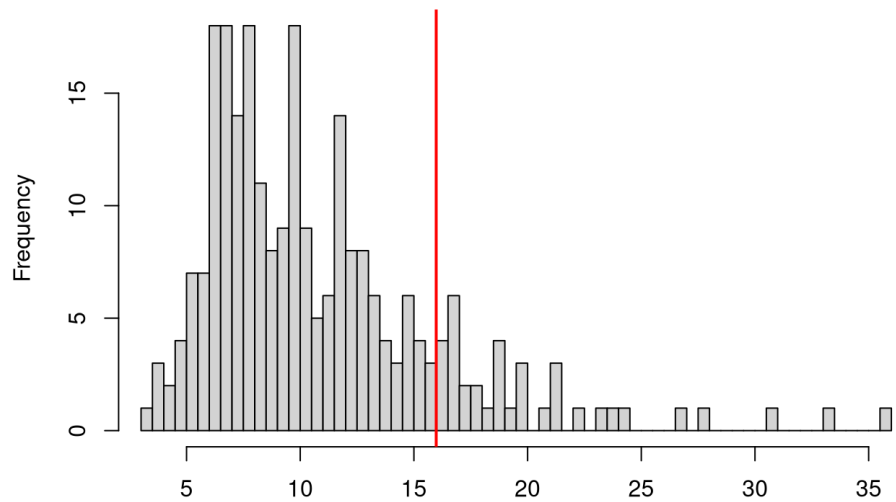
```
plotQQunif(srfm1)
```



Checking overdispersion:

```
testDispersion(srfm1)
```

DHARMA nonparametric dispersion test via sd of residuals fitted vs. simulated



Simulated values, red line = fitted model. p-value (two.sided) = 0.296

```
##
## DHARMA nonparametric dispersion test via sd of residuals fitted vs.
## simulated
##
## data: simulationOutput
## ratioObsSim = 1.4782, p-value = 0.296
## alternative hypothesis: two.sided
```

```
check_convergence(fm1)
```

```
## [1] TRUE
## attr(,"gradient")
## [1] 2.421327e-06
```

Intraclass correlation coefficient

```
icc(fm1)
```

```
## Warning: mu of 0.3 is too close to zero, estimate of
## random effect variances may
## be unreliable.
```

```
## # Intraclass Correlation Coefficient
##
## Adjusted ICC: 0.017
## Conditional ICC: 0.017
```

# Cow-level factors associated with subclinical mastitis in dairy cows in Santa Catarina State, Brazil

## Multivariable models

2020/12/04

```
library(car)
library(lme4)
library(lattice)
library(dplyr)
library(forcats)
library(ggplot2)
library(readr)
library(doBy)
library(performance)
library(nlme)
library(Amelia)
library(blmecco)
```

## The data

Farms were visited twice between 2016-2017, and cow-level, environmental and management variables hypothesized to be associated with mastitis were collected.

Subclinical mastitis was assessed by California Mastitis Test (CMT) reagent. The samples that reacted (thickening the milk) were considered positive ("1") and non-reacted samples were considered negative ("0").

Clinical mastitis was assessed by clinical inspection of the cows.

Censored observations:

- a. Cows diagnosed with mastitis in all quarters were censored for subclinical mastitis analyses.
- b. Quarters diagnosed with clinical mastitis were censored for subclinical mastitis analyses and vice versa.
- c. Cows with blind (non-functional) mammary quarters were censored for analyses regarding both clinical and subclinical mastitis

- d. Cows with mixed diagnosis were including in both analyses but censoring the quarters affected for other mastitis cause. The cows with mixed diagnosis:
- e. Quarters that were treated with antibiotics at the moment of the visit were censored

In addition, information on cows in the following lactating period was excluded from analyses:

Primiparous cows until 9 days after calving  
 Multiparous cows until 11 days after calving

(Doho et al 1993)

```
F5 <- read_csv("../..../data/cow/F5_Dec_06_20_cows_quarte
rs.csv")
```

```
## Warning: Missing column names filled in: 'X1' [1]
```

```
##
## — Column specification —————
## cols(
##   .default = col_double(),
##   Visit = col_character(),
##   `ID Cow` = col_character(),
##   `Management system` = col_character(),
##   Municipality = col_character(),
##   `Milking time` = col_character(),
##   Breed = col_character(),
##   `Lactation phase` = col_character(),
##   `Clinical quarter front left` = col_character(),
##   `Clinical quarter front right` = col_character(),
##   `Clinical quarter rear left` = col_character(),
##   `Clinical quarter rear right` = col_character(),
##   `Subc quarter front left` = col_character(),
##   `Subc quarter front right` = col_character(),
##   `Subc quarter rear left` = col_character(),
##   `Subc quarter rear right` = col_character(),
##   `Mammary quarter` = col_character(),
##   Breed_cat = col_character(),
##   Parity_cat2 = col_character(),
##   Researchers = col_character()
## )
## i Use `spec()` for the full column specifications.
```

F5 is a dataframe with information on 62 farms visited on winter and summer. It includes information on cows and quarters that were inspected during two visits to the farms in 2016 and 2017.

There is one row per mammary quarter per cow and visit. The columns show whether a mammary quarter was affected or not by one of the following dysfunctions:

- Subclinical mastitis
- Clinical mastitis
- Blind quarters

Individual cow identification was not possible, so we have no information on how many cows had true repeated measurements. For this reason we analyzed the data from each visit with one model each, instead of modeling all data with one model.

### Including a function: adjusted ICC

Computing adjusted intraclass correlation using latent variable approach.

The logistic distribution has “variance”  $\pi^2/3$

$ICC = \text{intercept\_variance} / (\text{intercept\_variance} + \pi^2/3)$

“x” = intercept\_variance

```
ICC_adj <- function(x){  
  x/(x + pi^2/3) * 100  
}
```

## Splitting the data: summer (F5S) and winter (F5W) visit

```
F5S <- F5 %>%  
  filter(Visit == "Summer")
```

```
F5W <- F5 %>%  
  filter(Visit == "Winter")
```

Selecting one line per cow (summer)

```
F5Sc <- F5S %>%  
  distinct(Farm, `ID Cow`, .keep_all = TRUE)
```

Selecting one line per cow (winter)

```
F5Wc <- F5W %>%  
  distinct(Farm, `ID Cow`, .keep_all = TRUE )
```

A dataframe with cow-level variables and data for two visits

```
F5C <- F5 %>%  
  distinct(Visit, Farm, `ID Cow`, .keep_all = TRUE)
```

# Multivariable associations

## Subclinical mastitis

Multilevel binary logistic regressions were fitted

The outcome variable was categorized as follows to be used in logistic regressions: individuals affected (“1”) or unaffected by subclinical mastitis (“0”).

Variables with significance on univariable analyses ( $p < 0.2$ ) were selected to be included in multivariable models.

## Summer visit

The following variables were included in the model for summer visit:

- Parity
- Lactation phase
- Researchers

```
summary(  
  fmm1 <- glmer(Affected_cows_sub ~ `Lactation phase`  
+ Parity_cat2 + Researchers +  
  (1|Farm), nAGQ = 12, family = binomial, data = F5Sc)  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ `Lactation phase` + Par
ity_cat2 + Researchers +
## (1 | Farm)
## Data: F5Sc
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 1374.0 1444.5 -673.0 1346.0 1126
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.2078 -0.6845 -0.5138 1.1219 2.6147
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.06001 0.245
## Number of obs: 1140, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z va
lue Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.54244 0.26583 -5.
802 6.54e-09 ***
## `Lactation phase`Late 0.42907 0.18855 2.
276 0.02287 *
## `Lactation phase`Mid 0.23597 0.18894 1.
249 0.21168
## `Lactation phase`Missing 0.04873 0.36998 0.
132 0.89521
## Parity_cat2Missing 1.07627 0.33749 3.
189 0.00143 **
## Parity_cat2Second 0.04988 0.25645 0.
195 0.84577
## Parity_cat2Third or greater 0.64952 0.20805 3.
122 0.00180 **
## ResearchersR2 0.06158 0.35417 0.
174 0.86196
## ResearchersR3 -0.27174 0.27012 -1.
006 0.31443
## ResearchersR4 -0.35569 0.26947 -1.
320 0.18684
## ResearchersR5 0.22045 0.23963 0.
920 0.35760
## ResearchersR6 -1.01064 0.49534 -2.
040 0.04132 *
## ResearchersR7 0.10896 0.26497 0.
411 0.68093
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1

```



```
##
## Correlation matrix not shown by default, as p = 13 >
12.
## Use print(x, correlation=TRUE) or
##     vcov(x)         if you need it
```

```
Anova(fmm1)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
`Lactation phase`	5.808576	3	0.1213040289
Parity_cat2	19.966176	3	0.0001725043
Researchers	10.161612	6	0.1180090929

3 rows

Removing “lactation phase” variable from model

```
summary(fmm1_a <- update(fmm1, .~. - `Lactation phase`
) )
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ Parity_cat2 + Researche
rs + (1 | Farm)
## Data: F5Sc
##
##      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
## 1373.9   1429.3  -675.9   1351.9    1129
##
## Scaled residuals:
##      Min      1Q   Median      3Q      Max
## -1.0859 -0.6905 -0.5170  1.0953  2.3879
##
## Random effects:
## Groups Name      Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.06777  0.2603
## Number of obs: 1140, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)    -1.34700    0.22697  -5.935 2.94e-09 ***
## Parity_cat2Missing  1.01116    0.27529   3.673 0.00024 ***
## Parity_cat2Second  0.05580    0.25633   0.218 0.82911
```

```

218 0.82767
## Parity_cat2Third or greater 0.68097 0.20777 3.
278 0.00105 **
## ResearchersR2 0.09314 0.34009 0.
274 0.78418
## ResearchersR3 -0.25158 0.26603 -0.
946 0.34429
## ResearchersR4 -0.33779 0.26672 -1.
266 0.20535
## ResearchersR5 0.23807 0.22906 1.
039 0.29865
## ResearchersR6 -0.97629 0.49446 -1.
974 0.04833 *
## ResearchersR7 0.14417 0.26096 0.
552 0.58062
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) Prt_2M Prt_2S P_2Tog RsrcR2 RsrcR
3 RsrcR4 RsrcR5 RsrcR6
## Prty_ct2Mss -0.646
## Prty_ct2Scn -0.554 0.456
## Prty_ct2Tog -0.684 0.554 0.626
## ReserchrsR2 -0.306 0.047 0.012 0.002
## ReserchrsR3 -0.404 0.198 0.011 -0.051 0.253
## ReserchrsR4 -0.414 0.217 -0.024 -0.014 0.245 0.36
6
## ReserchrsR5 -0.378 0.022 0.009 -0.041 0.253 0.35
1 0.350
## ReserchrsR6 -0.194 0.085 -0.016 -0.061 0.138 0.20
2 0.197 0.189
## ReserchrsR7 -0.392 0.171 -0.069 -0.057 0.261 0.37
2 0.371 0.348 0.203

```

```
Anova(fmm1_a)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
Parity_cat2	23.36458	3	3.389883e-05
Researchers	10.06647	6	1.218804e-01

2 rows

Removing “lactation phase” variable from model

```
summary(fmm1_b <- update(fmm1_a, .~. -Researchers))
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ Parity_cat2 + (1 | Farm
)
## Data: F5Sc
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 1371.8 1397.0 -680.9 1361.8 1135
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.0891 -0.6695 -0.5212 1.0695 2.3306
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.1298 0.3603
## Number of obs: 1140, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z va
lue Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.42932 0.19237 -7.
430 1.09e-13 ***
## Parity_cat2Missing 1.11155 0.28672 3.
877 0.000106 ***
## Parity_cat2Second 0.05237 0.25716 0.
204 0.838628
## Parity_cat2Third or greater 0.68030 0.20894 3.
256 0.001130 **
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) Prt_2M Prt_2S
## Prty_ct2Mss -0.620
## Prty_ct2Scn -0.678 0.452
## Prty_ct2Tog -0.857 0.551 0.630

```

```
Anova(fmm1_b)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
Parity_cat2	24.77423	3	1.721312e-05
1 row			

```
icc(fmm1_b)
```

```
## # Intraclass Correlation Coefficient
##
##      Adjusted ICC: 0.038
##      Conditional ICC: 0.036
```

```
ICC_adj(0.1298)
```

```
## [1] 3.79569
```

4% of the variation in subclinical mastitis proportion is associated with the farm effect.

```
exp(fixef(fmm1_b))
```

```
##              (Intercept)              Parity_cat2Missing
##              0.2394709              3.0390
##              Parity_cat2Second Parity_cat2Third or greater
##              1.0537656              1.9744
##              760
```

Odds ratio

```
exp(confint(fmm1_b, method = "Wald"))
```

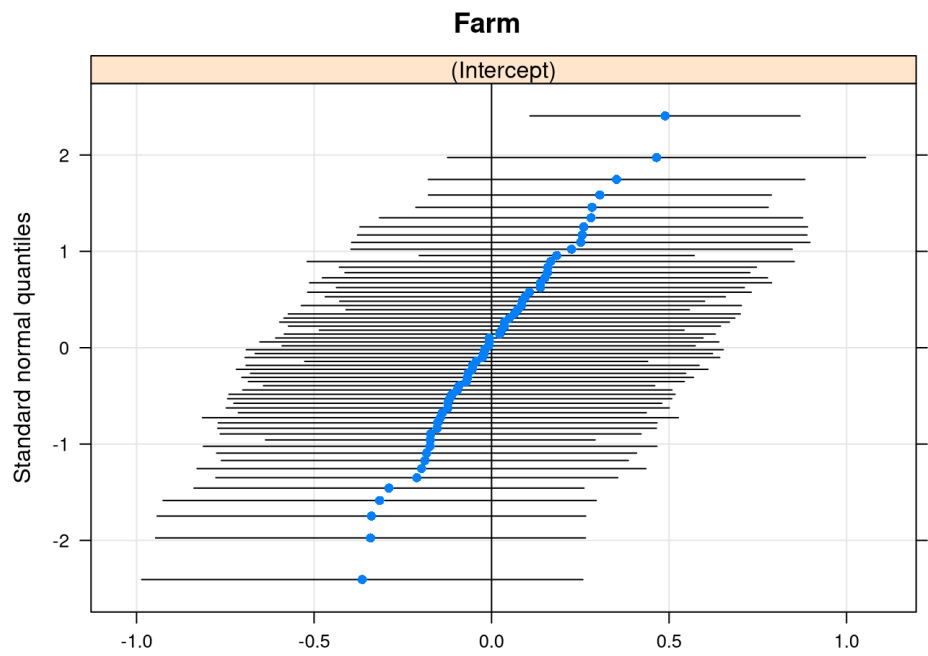
```
##              2.5 %    97.5 %
## .sig01              NA        NA
## (Intercept)        0.1642506 0.3491392
## Parity_cat2Missing  1.7325356 5.3308850
## Parity_cat2Second  0.6365766 1.7443648
## Parity_cat2Third or greater 1.3109971 2.9737332
```

**Goodness of fit**

Random effect

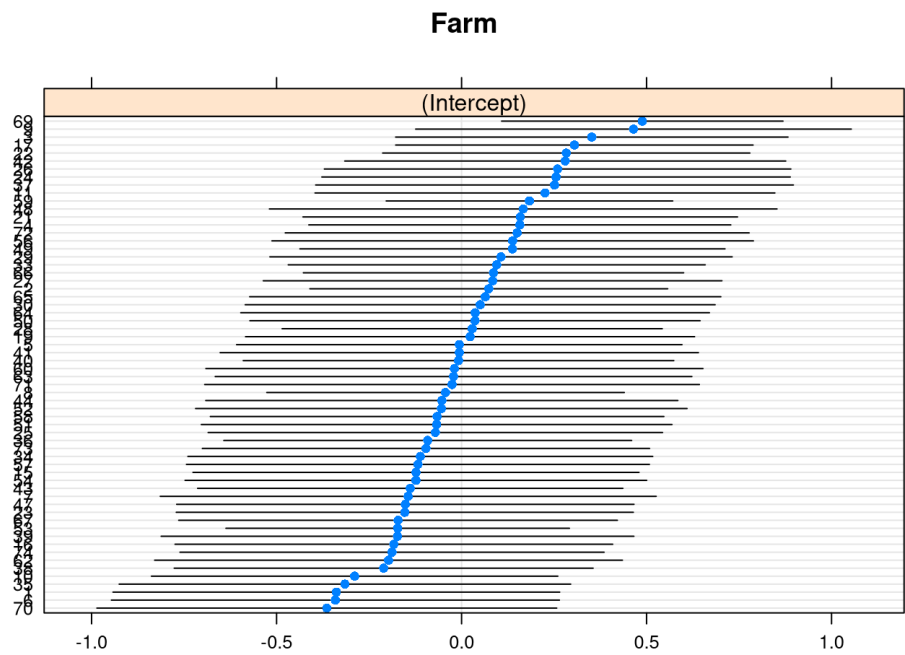
```
qqmath(ranef(fmm1_b))
```

```
## $Farm
```

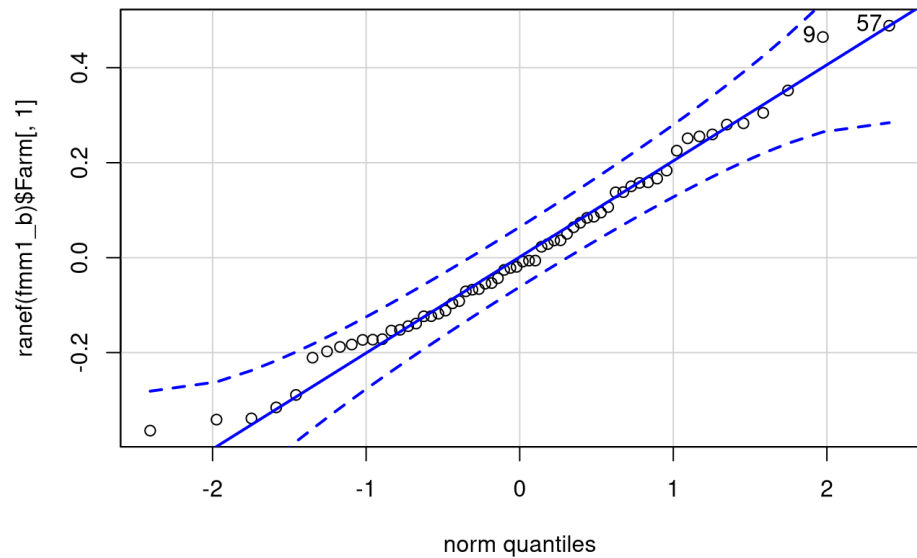


```
dotplot(ranef(fmm1_b, condVar = TRUE))
```

```
## $Farm
```



```
qqPlot(ranef(fmm1_b)$Farm[,1])
```



```
## [1] 57 9
```

Checking dispersion

```
dispersion_glmmer(fmm1_b)
```

```
## [1] 1.083964
```

## Winter visit

Variables with significance in univariable analysis ( $p < 0.2$ ) were selected to be included in multivariable models:

The following variables were included in the model including data for winter visit

- Parity
- Lactation phase
- Researchers
- Clinical mastitis

```
summary(
  fmm1w <- glmmer(Affected_cows_sub ~ `Lactation phase`
  + Parity_cat2 +
  Researchers + Affected_cows_clin
  +
  (1|Farm), nAGQ = 12, family = binomial, data = F5Wc)
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ `Lactation phase` + Par
ity_cat2 + Researchers +
## Affected_cows_clin + (1 | Farm)
## Data: F5Wc
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 1287.1 1357.3 -629.6 1259.1 1099
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.5708 -0.6297 -0.4488 0.8941 3.4476
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.4391 0.6627
## Number of obs: 1113, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z v
alue Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.744426 0.446124 -3
.910 9.22e-05 ***
## `Lactation phase`Late 0.456658 0.215828 2
.116 0.0344 *
## `Lactation phase`Mid -0.003823 0.226610 -0
.017 0.9865
## `Lactation phase`Missing 0.173669 0.508650 0
.341 0.7328
## Parity_cat2Missing 1.046257 0.454388 2
.303 0.0213 *
## Parity_cat2Second 0.331744 0.331432 1
.001 0.3169
## Parity_cat2Third or greater 1.051676 0.268756 3
.913 9.11e-05 ***
## ResearchersR2 -0.744723 0.519492 -1
.434 0.1517
## ResearchersR3 -0.415701 0.459816 -0
.904 0.3660
## ResearchersR4 -0.407193 0.463719 -0
.878 0.3799
## ResearchersR5 -0.039568 0.453675 -0
.087 0.9305
## ResearchersR7 -0.446182 0.486003 -0
.918 0.3586
## Affected_cows_clin 0.504365 0.399275 1
.263 0.2065
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1

```

```
##
## Correlation matrix not shown by default, as p = 13 >
12.
## Use print(x, correlation=TRUE) or
##     vcov(x)         if you need it
```

```
Anova(fmmlw)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
`Lactation phase`	6.482205	3	0.0903669335
Parity_cat2	19.892822	3	0.0001786485
Researchers	3.333123	5	0.6487745036
Affected_cows_clin	1.595676	1	0.2065170773

4 rows

### Removing Researchers variable

```
summary(fmmlw_a <- update(fmmlw, .~. - Researchers))
```

```
## Warning in checkConv(attr(opt, "derivs"), opt$par, c
trl = control$checkConv, :
## Model failed to converge with max|grad| = 0.0038964
(tol = 0.002, component 1)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula:
## Affected_cows_sub ~ `Lactation phase` + Parity_cat2
+ Affected_cows_clin +
## (1 | Farm)
## Data: F5Wc
##
## AIC      BIC    logLik deviance df.resid
## 1280.5   1325.6  -631.3  1262.5    1104
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.5559 -0.6240 -0.4575  0.8670  3.4497
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.4655   0.6823
## Number of obs: 1113, groups: Farm, 62
##
```



```

## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      -2.08756    0.29474  -7.083 1.41e-12 ***
## `Lactation phase`Late      0.47646    0.21484   2.218  0.0266 *
## `Lactation phase`Mid       0.02507    0.22511   0.111  0.9113
## `Lactation phase`Missing   0.43219    0.45096   0.958  0.3379
## Parity_cat2Missing        1.12392    0.44693   2.515  0.0119 *
## Parity_cat2Second         0.33878    0.33129   1.023  0.3065
## Parity_cat2Third or greater 1.05035    0.26775   3.923  8.75e-05 ***
## Affected_cows_clin        0.50603    0.39784   1.272  0.2034
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Lph`L `Lcttnphs`Md `Lcttnphs`Ms
Prt_2M Prt_2S P_2Tog
## `Lcttnphs`L  -0.396
## `Lcttnphs`Md -0.391  0.547
## `Lcttnphs`Ms -0.215  0.273  0.266
## Prty_ct2Mss  -0.433 -0.013 -0.001      -0.572
## Prty_ct2Scn  -0.608  0.003  0.022      0.026
0.372
## Prty_ct2Tog  -0.747 -0.024 -0.020      -0.043
0.522  0.657
## Affctd_cws_  -0.043  0.016  0.011      0.028
-0.045  0.031  0.012
## optimizer (Nelder_Mead) convergence code: 0 (OK)
## Model failed to converge with max|grad| = 0.0038964
(tol = 0.002, component 1)

```

```
Anova(fmmlw_a)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
`Lactation phase`	6.971793	3	0.0728022913
Parity_cat2	20.065792	3	0.0001644957
Affected_cows_clin	1.617852	1	0.2033915137

```
3 rows
```

## Removing clinical mastitis from model

```
summary(fmmlw_b <- update(fmmlw_a, .~. - Affected_cows_
clin))
```

```
## Warning in checkConv(attr(opt, "derivs"), opt$par, c
trl = control$checkConv, :
## Model failed to converge with max|grad| = 0.00452083
(tol = 0.002, component 1)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ `Lactation phase` + Par
ity_cat2 + (1 | Farm)
## Data: F5Wc
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 1280.1 1320.2 -632.1 1264.1 1105
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.5454 -0.6239 -0.4594 0.9446 3.4411
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.4712 0.6864
## Number of obs: 1113, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z va
lue Pr(>|z|)
## (Intercept) -2.07246 0.29400 -7.
049 1.80e-12 ***
## `Lactation phase`Late 0.47271 0.21473 2.
201 0.0277 *
## `Lactation phase`Mid 0.02205 0.22503 0.
098 0.9219
## `Lactation phase`Missing 0.41588 0.45302 0.
918 0.3586
## Parity_cat2Missing 1.15110 0.44776 2.
571 0.0101 *
## Parity_cat2Second 0.32651 0.33068 0.
987 0.3234
## Parity_cat2Third or greater 1.04637 0.26715 3.
917 8.98e-05 ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
```

```
## (Intr) `Lph`L `Lcttnphs`Md `Lcttnphs`Ms
Prt_2M Prt_2S
## `Lcttnphs`L -0.396
## `Lcttnphs`Md -0.391 0.547
## `Lcttnphs`Ms -0.214 0.272 0.265
## Prty_ct2Mss -0.432 -0.014 -0.002 -0.574
## Prty_ct2Scn -0.606 0.003 0.022 0.025
0.371
## Prty_ct2Tog -0.746 -0.024 -0.021 -0.044
0.520 0.656
## optimizer (Nelder_Mead) convergence code: 0 (OK)
## Model failed to converge with max|grad| = 0.00452083
(tol = 0.002, component 1)
```

```
Anova(fmm1w_b)
```

	<b>Chisq</b> <dbl>	<b>Df</b> <dbl>	<b>Pr(&gt;Chisq)</b> <dbl>
`Lactation phase`	6.873165	3	0.0760521964
Parity_cat2	20.258382	3	0.0001500473

2 rows

Removing lactation phase from model

```
summary(fmm1w_c <- update(fmm1w_b, .~. - `Lactation phase`))
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: Affected_cows_sub ~ Parity_cat2 + (1 | Farm
)
## Data: F5Wc
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 1281.0 1306.0 -635.5 1271.0 1108
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.5660 -0.6218 -0.4479 0.9003 3.2025
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.4711 0.6864
## Number of obs: 1113, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z va
lue Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.9008 0.2616 -7.
266 3.70e-13 ***
## Parity_cat2Missing 1.3183 0.3595 3.
667 0.000246 ***
## Parity_cat2Second 0.3329 0.3297 1.
010 0.312595
## Parity_cat2Third or greater 1.0715 0.2664 4.
021 5.78e-05 ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) Prt_2M Prt_2S
## Prty_ct2Mss -0.675
## Prty_ct2Scn -0.675 0.479
## Prty_ct2Tog -0.855 0.617 0.661

```

```
Anova(fmm1w_c)
```

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
Parity_cat2	24.18921	3	2.280781e-05
1 row			

```
icc(fmm1w_c)
```

```
## # Intraclass Correlation Coefficient
##
##      Adjusted ICC: 0.125
##      Conditional ICC: 0.118
```

```
ICC_adj(0.4711)
```

```
## [1] 12.52603
```

12% of the variation in subclinical mastitis proportion is associated with the farm effect.

```
exp(fixef(fmmlw_c))
```

```
##              (Intercept)              Parity_cat2Missing
##              0.1494474                3.7369
245
##              Parity_cat2Second Parity_cat2Third or greater
##              1.3950307                2.9197
049
```

Odds ratio

```
exp(confint(fmmlw_c, method = "Wald"))
```

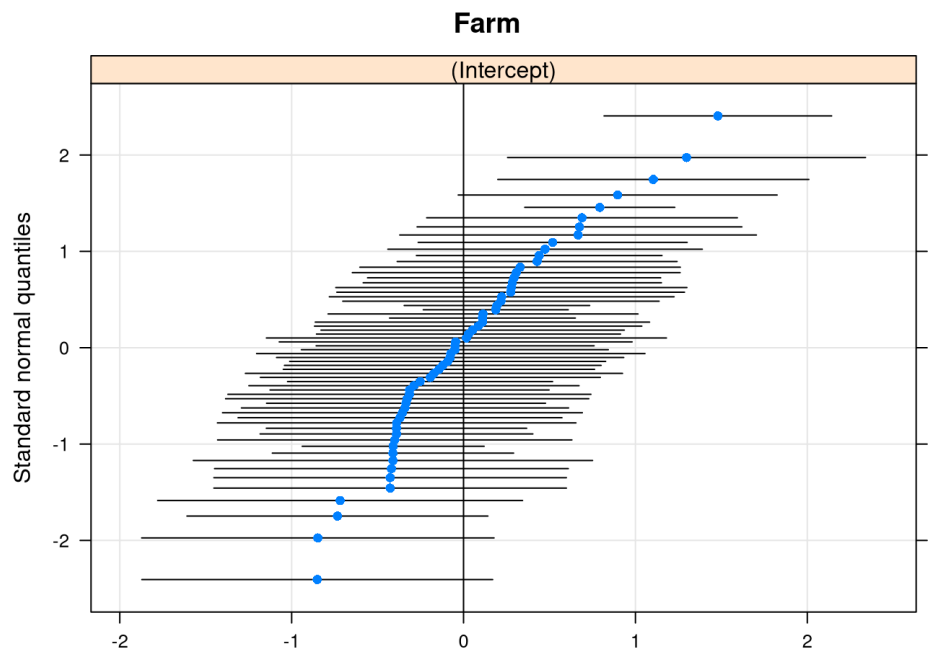
```
##              2.5 %    97.5 %
## .sig01              NA        NA
## (Intercept)        0.08949893 0.2495507
## Parity_cat2Missing  1.84704678 7.5605040
## Parity_cat2Second   0.73105907 2.6620431
## Parity_cat2Third or greater 1.73198920 4.9218995
```

**Goodness of fit**

Random effect

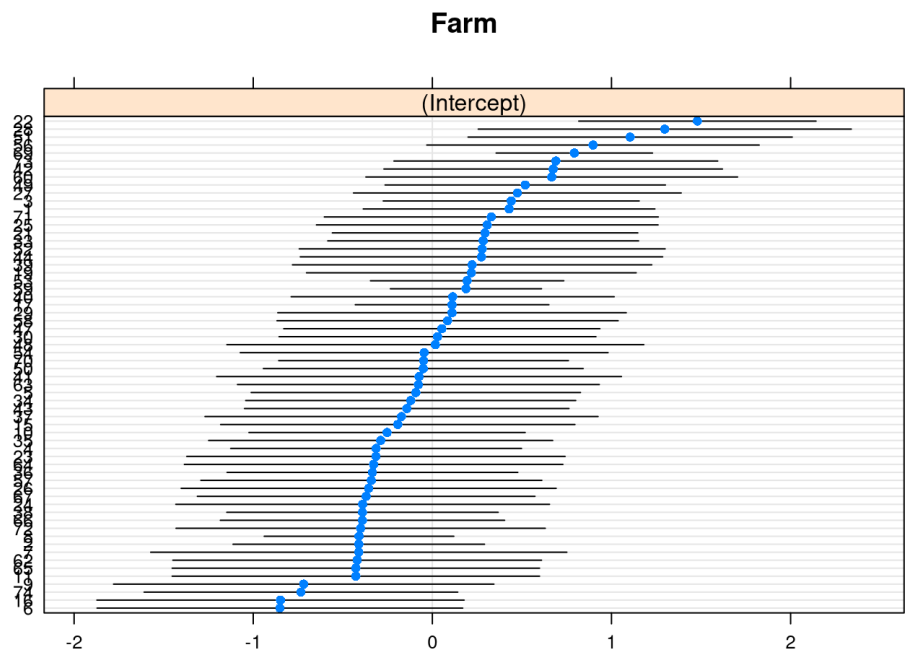
```
qqmath(ranef(fmmlw_c))
```

```
## $Farm
```

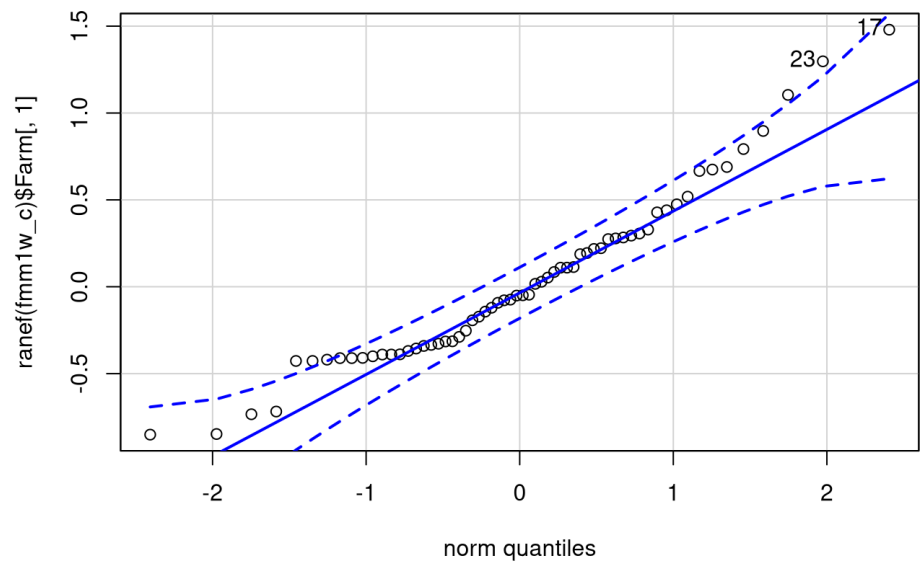


```
dotplot(ranef(fmmlw_c, condVar = TRUE))
```

```
## $Farm
```



```
qqPlot(ranef(fmmlw_c)$Farm[,1])
```



```
## [1] 17 23
```

Checking dispersion

```
dispersion_glmmer(fmm1w_c)
```

```
## [1] 1.046857
```

Data description
Null models
Breed
Researchers
Milking time
Milking parlour type
Milking parlour walls
Milking parlour floor
Farms with feeders in the milking parlour
Holding area floor type
Post-milking area floor
Post-milking area floor cleanliness
Did the farmers feed the cows while milking?
Pre-dipping solution
Post-dipping solution use
Milk flow system
Milking frequency
Milking interval - hours from last milking at evening to milking in the morning
Subclinical mastitis predicted from clinical mastitis
Subclinical

# Herd-level factors associated with subclinical mastitis in dairy cows in Santa Catarina State, Brazil

## Univariable and multivariable models

2020/11/2

```
library(car)
#library(ggbiplot)
library(lme4)
library(lattice)
library(tidyverse)
library(doBy)
library(performance)
library(nlme)
library(Amelia)
library(blme)
library(blme)
library(reshape2)
library(merTools)
library(DHARMA)
library(arm)
library(sjPlot)
library(merTools)
library(influence.ME)
```

## Data description

Data were collected in a cross-sectional study aimed at investigating factors associated with clinical and subclinical mastitis in dairy herds managed under different systems:

- Compost-bedded packs
- Freestall
- Grazing low-input systems
- Grazing high-input systems
- Agroecological systems

Farms were visited twice during winter and summer between 2016-2017. Cow-level, environmental and management variables were collected.



mastitis predicted  
from blind quarters

Multivariable  
model

Final multivariable  
model: subclinical  
mastitis

Subclinical mastitis was assessed using California Mastitis Test (CMT) reagent. The samples that reacted (thickening the milk) were considered positive ("1") and non-reacted samples were considered negative ("0").

Clinical mastitis was assessed by clinical inspection of the cows.

Censored observations:

- a. Cows diagnosed with mastitis in all quarters were censored for subclinical mastitis analyses.
- b. Quarters diagnosed with clinical mastitis were censored for subclinical mastitis analyses and vice versa.
- c. Cows with blind (non-functional) mammary quarters were censored for analyses regarding both clinical and subclinical mastitis
- d. Cows with mixed diagnosis were including in both analyses, but censoring the quarters affected for other mastitis cause.
- e. Quarters that were treated with antibiotics at the moment of the visit were censored for any analyses

In addition, information on cows in the following period of lactation was excluded from analyses (Doho et al 1993):

- Primiparous cows until 9 days after calving
- Multiparous cows until 11 days after calving

Data were inspected for typing errors or inconsistencies and dataframe cleaned manually or within R scripts:

- A table with the 62 farms and Herd-level variables was saved:

```
write.csv(H, file = "Herd_level_dec_17_2019.csv")
```

See script: "Herd level clean dec 17 2019.Rmd"

- Additional changes were introduced in the dataframe:

See script "Herd level description clean dec 18"

- Then, a new dataframe was saved:

```
write.csv(H, "Herd_level_feb_06_2020.csv")
```

- After that, another dataframe saved:

```
write.csv(Hm, file = ".././data/herd/Herd_level_dec_02_2020.csv")
```

```
Hm <- read_csv(".././data/herd/Herd_level_dec_02_2020.csv")
```

```
## Warning: Missing column names filled in: 'X1' [1]
```

```
##
## — Column specification —————
##
## cols(
##   .default = col_double(),
##   `Management system` = col_character(),
##   Visit = col_character(),
##   Municipality = col_character(),
##   Farmer = col_character(),
##   `Management system2` = col_character(),
##   Researcher = col_character(),
##   `Milking time` = col_character(),
##   `Milking parlour` = col_character(),
##   `Milking parlour walls` = col_character(),
##   `In-parlour feeder` = col_character(),
##   `Holding area floor` = col_character(),
##   `Feed cows while milking` = col_character(),
##   `Pre-dipping solution` = col_character(),
##   `Post-dipping solution` = col_character(),
##   `Milk flow system` = col_character(),
##   `Milking interval hours` = col_character(),
##   `Type of milking parlour floor` = col_character(),
##   `Milking parlour floor cleanliness` = col_character(),
##   `Milking parlour floor surface` = col_character(),
##   `Post-milking area floor cleanliness` = col_character()
##   # ... with 9 more columns
## )
## i Use `spec()` for the full column specifications.
```

## Null models

Subclinical mastitis:

The number of affected cows per herd was modeled using a mixed-effects Poisson model with the natural logarithm link function.

The farm was included as random effect to account for repeated measurements in each herd in winter and summer.

We used the count of affected cows as outcome variable and the lactating herd size (logarithmic scale) as an offset, to account for differences in herd size between farms.

```
summary(
  fmn <- glmer(`Affected cows scm` ~ 1 + (1| Farm),
    data = Hm,
    family = "poisson",
    offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ 1 + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    551.3      556.9   -273.7    547.3     122
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.81999 -0.58678 -0.08247  0.47243  2.77516
##
## Random effects:
##  Groups Name          Variance Std.Dev.
##  Farm  (Intercept) 0.09703  0.3115
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.31384    0.06189  -21.23  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1

```

## Breed

Univariable model: proportion of Holstein breed in the farms - nonsignificant

```

summary(
  mb <- glmer(`Affected cows scm` ~ Prop.Hm + (1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ Prop.Hm + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    552.9      561.4   -273.5    546.9      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.83551 -0.60695 -0.09517  0.49281  2.78001
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09332  0.3055
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)  -1.3772     0.1230  -11.19  <2e-16 ***
## Prop.Hm       0.1048     0.1747   0.60   0.548
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## Prop.Hm -0.867

```

Univariable model: proportion of Jersey breed in the farms - nonsignificant

```

summary(
  mbj <- glmer(`Affected cows scm` ~ Prop.J + (1|Farm
),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ Prop.J + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    553.2      561.7   -273.6    547.2     121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.82337 -0.60122 -0.08705  0.48057  2.78696
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09663  0.3108
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.30050    0.08172 -15.915  <2e-16 ***
## Prop.J       -0.06247    0.25232  -0.248   0.804
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##          (Intr)
## Prop.J -0.655

```

Univariable model: proportion of crossbreed cows in the farms - nonsignificant

```

summary(
  mbcb <- glmer(`Affected cows scm` ~ prop.Cb + (1|Farm),
    data = Hm,
    family = "poisson",
    offset = log(`Lactating herd size`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ prop.Cb + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    552.9      561.3   -273.4    546.9      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.83700 -0.60290 -0.09548  0.45290  2.75009
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09148  0.3025
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.28039    0.07823 -16.366  <2e-16 ***
## prop.Cb      -0.18343    0.27576  -0.665   0.506
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## prop.Cb -0.627

```

## Researchers

Subclinical mastitis and researcher: significant

```

summary(
  mr <- glmer(`Affected cows scm` ~ Researchers + (1|
Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ Researchers + (1 | Fa
rm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 553.0 575.6 -268.5 537.0 116
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.89981 -0.57050 -0.09867 0.50689 2.87300
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.06768 0.2601
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.132733 0.095582 -11.851 <2e-16
***
## ResearchersR2 -0.289729 0.214219 -1.352 0.1762
## ResearchersR3 -0.288092 0.172614 -1.669 0.0951
.
## ResearchersR4 -0.414460 0.176967 -2.342 0.0192
*
## ResearchersR5 -0.002193 0.134994 -0.016 0.9870
## ResearchersR6 -0.815892 0.432560 -1.886 0.0593
.
## ResearchersR7 -0.176159 0.176220 -1.000 0.3175
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) RsrcR2 RsrcR3 RsrcR4 RsrcR5 RsrcR
6
## ReserchrsR2 -0.430
## ReserchrsR3 -0.544 0.235
## ReserchrsR4 -0.536 0.231 0.293
## ReserchrsR5 -0.534 0.233 0.295 0.288
## ReserchrsR6 -0.186 0.108 0.102 0.100 0.101
## ReserchrsR7 -0.524 0.228 0.289 0.283 0.288 0.09
9

```

## Milking time

Univariable model: milking time nonsignificant

```
summary(
  mmt <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking time` +
(1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking time` + (1 |
Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 553.3 561.7 -273.6 547.3 121
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.82697 -0.59436 -0.08155 0.46525 2.78470
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09668 0.3109
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error z value Pr
(>|z|)
## (Intercept) -1.32080 0.07689 -17.177
<2e-16 ***
## `Milking time`Morning 0.01452 0.09506 0.153
0.879
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr)
## `Mlkngrm`Mr -0.594
```

## Milking parlour type

Univariable models: subclinical mastitis and milking parlour type: non-significant



```
summary(
  mMP <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking parlour`
  + (1| Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking parlour` + (
1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    552.2      560.7    -273.1   546.2      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8178 -0.6059 -0.1064  0.4436  2.7089
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09098  0.3016
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value
Pr(>|z|)
## (Intercept)          -1.24614    0.08705  -14.32
<2e-16 ***
## `Milking parlour`Tunnel -0.12420    0.11830   -1.05
0.294
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Mlknprlr`T -0.716
```

## Milking parlour walls

Univariable models: subclinical mastitis and milking parlour walls: non-significant

```
summary(
  mPw <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking parlour
walls` + (1| Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking parlour wall
s` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    554.6      565.8    -273.3   546.6      120
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8305 -0.6192 -0.0834  0.4895  2.8783
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09452  0.3074
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##                                     Estimate Std. Error z v
alue Pr(>|z|)
## (Intercept)                       -1.27288    0.08902 -14
.300 <2e-16 ***
## `Milking parlour walls`Mixed -0.11734    0.13914  -0
.843    0.399
## `Milking parlour walls`Wood  -0.01799    0.15086  -0
.119    0.905
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Mpw`M
## `Mlkwlls`M -0.617
## `Mlkwlls`W -0.578  0.362
```

## Milking parlour floor

### Type

There is no variation for milking parlour floor type

```
count(Hm, `Type of milking parlour floor`)
```

Type of milking parlour floor	n
<chr>	<int>
Concrete	120
Dirt floor	2
Rubber	2
3 rows	

## Floor cleanliness

```
count(Hm, `Milking parlour floor cleanliness`)
```

Milking parlour floor cleanliness	n
<chr>	<int>
Clean	105
Dirty	19
2 rows	

Score was not totally consistent in 17 farms (Dirt and Clean in the same farm)

```
Hm %>%  
  count(Farm, `Milking parlour floor cleanliness`) %>%  
  filter(n == 1)
```

Fa...	Milking parlour floor cleanliness	n
<dbl>	<chr>	<int>
11	Clean	1
11	Dirty	1
22	Clean	1
22	Dirty	1
25	Clean	1
25	Dirty	1
29	Clean	1
29	Dirty	1

35 Clean	1
35 Dirty	1
1-10 of 34 rows	Previous <b>1</b> 2 3 4 Next

### Subclinical mastitis and milking parlour floor cleanliness significant

```
summary(  
  mPc <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking parlour  
floor cleanliness` + (1|Farm),  
  data = Hm,  
  family = "poisson",  
  offset = log(`Lactating herd size`))  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking parlour floo
r cleanliness` + (1 |
## Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 549.0 557.5 -271.5 543.0 121
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.79704 -0.55428 -0.03901 0.42724 2.84444
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.08826 0.2971
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate St
d. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.34626
0.06294 -21.390 <2e-16
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty 0.21761
0.10334 2.106 0.0352
##
## (Intercept) ***
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty *
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr)
## `Mpfclnln`D -0.269

```

## Milking parlour floor surface state

Subclinical mastitis and conservation of milking parlour floor  
nonsignificant

```

summary(
  mPf <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking parlour
floor surface` + (1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)

```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking parlour floo
r surface` + (1 |
## Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 552.5 561.0 -273.2 546.5 121
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.83226 -0.56924 -0.09652 0.47237 2.75216
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09323 0.3053
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std.
Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.4241
0.1383 -10.300 <2e-16 ***
## `Milking parlour floor surface`Regular 0.1380
0.1531 0.902 0.367
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr)
## `Mlpfsrfc`R -0.897

```

## Farms with feeders in the milking parlour

Subclinical mastitis and presence of feeders in milking parlour  
nonsignificant

```
summary(
  mPfb <- glmer(`Affected cows scm` ~ `In-parlour feeder` + (1|Farm),
    data = Hm,
    family = "poisson",
    offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `In-parlour feeder` +
## (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    551.9    560.3   -272.9    545.9     121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8266 -0.5972 -0.1053  0.4433  2.6962
##
## Random effects:
##  Groups Name          Variance Std.Dev.
##  Farm   (Intercept)  0.08975  0.2996
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr
r(>|z|)
## (Intercept)          -1.23329    0.08772  -14.06
<2e-16 ***
## `In-parlour feeder`Yes -0.14404    0.11803   -1.22
0.222
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `In-prfdr`Y -0.724
```

## Holding area floor type

Subclinical mastitis and holding area floor type: nonsignificant

```
summary(
  mha <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Holding area floor` + (1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Holding area floor`
+ (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    554.8      566.1   -273.4    546.8      120
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8000 -0.6007 -0.1018  0.4818  2.7355
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09346  0.3057
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##                                     Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)                        -1.2730495  0.0874867 -14.551 <2e-16 ***
## `Holding area floor`Dirt            -0.0871162  0.1234698  -0.706  0.480
## `Holding area floor`Other          -0.0004629  0.2390683  -0.002  0.998
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Haf`D
## `Hldnaflr`D -0.690
## `Hldnaflr`O -0.349  0.246
```

## Post-milking area floor

Subclinical mastitis and post-milking area floor assessment  
nonsignificant



```
summary(
  mpaf <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Post-milking a
rea floor2` + (1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Post-milking area fl
oor2` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    554.7      566.0   -273.4   546.7      120
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.80855 -0.57962 -0.09022  0.48059  2.71032
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.09431  0.3071
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error
z value Pr(>|z|)
## (Intercept)          -1.2542    0.1013
-12.376 <2e-16 ***
## `Post-milking area floor2`Dirt   -0.0802    0.1285
-0.624    0.533
## `Post-milking area floor2`Other -0.1391    0.2086
-0.667    0.505
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `P-af2`D
## `Pst-af12`D -0.770
## `Pst-af12`O -0.477  0.373
```

## Post-milking area floor cleanliness

Subclinical mastitis and post-milking area floor cleanliness Significant

```
summary(
  mpaafc <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Post-milking
area floor cleanliness` + (1| Farm),
                data = Hm,
                family = "poisson",
                offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Post-milking area fl
oor cleanliness` +
## (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
##   546.0    554.4   -270.0    540.0     121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.77457 -0.59320 -0.07843  0.54802  2.58213
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.06937  0.2634
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##                                     Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)                                     -1.41967
0.07098 -20.001 < 2e-16
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.27521
0.09811  2.805  0.00503
##
## (Intercept)                                     ***
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Pst-afcl`D -0.581
```

**Did the farmers feed the cows while milking?**

Subclinical mastitis and whether the farmers reported to feed the cows while milking: nonsignificant

```
summary(  
  mfc <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Feed cows while  
milking` + (1| Farm),  
              data = Hm,  
              family = "poisson",  
              offset = log(`Lactating herd size`))  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Feed cows while milk
ing` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 552.6 563.9 -272.3 544.6 120
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.81575 -0.59089 -0.09677 0.45537 2.73307
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.08794 0.2966
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std
. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.2589
0.0826 -15.242 <2e-16
## `Feed cows while milking`During milking -0.1489
0.1217 -1.223 0.221
## `Feed cows while milking`No 0.2192
0.2568 0.854 0.393
##
## (Intercept) ***
## `Feed cows while milking`During milking
## `Feed cows while milking`No
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `Fcwmm
## `Fcwmlkn`Dm -0.660
## `Fcwmlkng`N -0.316 0.210

```

## Pre-dipping solution

Subclinical mastitis and pre-dipping solution used in the farm: significant

```
summary(
  mps <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Pre-dipping so
lution` + (1|Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Pre-dipping solution
` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    550.3      558.8   -272.2    544.3      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8684 -0.5659 -0.1502  0.4722  2.9450
##
## Random effects:
##  Groups Name          Variance Std.Dev.
##  Farm   (Intercept) 0.08667  0.2944
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)          -1.41716    0.08693 -16.302 <2e-16 ***
## `Pre-dipping solution`Liquid  0.20451    0.11625  1.759  0.0786 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Pr-dsltn`L -0.715
```

## Post-dipping solution use

No variation in the variable...

```
table(Hm$`Post-dipping solution`)
```

```
##  
## No Yes  
## 2 122
```

## Milk flow system

Univariable models: subclinical mastitis and milk flow system used in the farm: nonsignificant

```
summary(  
  mfs <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milk flow system` + (1| Farm),  
              data = Hm,  
              family = "poisson",  
              offset = log(`Lactating herd size`))  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milk flow system` +
(1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 553.6 564.9 -272.8 545.6 120
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.85016 -0.62954 -0.09306 0.48529 2.87314
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.08747 0.2958
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Erro
r z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.19625 0.1105
0 -10.826 <2e-16 ***
## `Milk flow system`Low line -0.03162 0.2693
6 -0.117 0.907
## `Milk flow system`Portable milker -0.16966 0.1306
4 -1.299 0.194
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `Mfs`l
## `Mfsystem`Ll -0.408
## `Mfsystem`Pm -0.828 0.339

```

## Milking frequency

Similar in all farms

```
table(Hm$`Milking frequency`)
```

```
##
## 2
## 124
```

# Milking interval -hours from last milking at evening to milking in the morning

Subclinical mastitis and milking interval difference: nonsignificant

```
summary(  
  mi <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking interval  
difference` + (1|Farm),  
  data = Hm,  
  family = "poisson",  
  offset = log(`Lactating herd size`))  
)
```



```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Milking interval dif
ference` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 554.1 565.4 -273.0 546.1 120
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.8359 -0.6161 -0.1052 0.4777 2.7494
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.08968 0.2995
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
## Estimat
e Std. Error z value
## (Intercept) -1.275460
5 0.1049875 -12.149
## `Milking interval difference`0 to < 1 hour -0.161360
9 0.1649210 -0.978
## `Milking interval difference`1 hour -0.000256
2 0.1338718 -0.002
## Pr(>|z|)
## (Intercept) <2e-16
***
## `Milking interval difference`0 to < 1 hour 0.328
## `Milking interval difference`1 hour 0.998
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `idt<1h
## `Midf`0t<1h -0.631
## `Midffrn`1h -0.755 0.480

```

## Subclinical mastitis predicted from clinical mastitis

significant

```
summary(
  msc <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Affected cows
cm` + (1| Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Affected cows cm` +
(1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    546.1      554.6   -270.0    540.1      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8665 -0.6522 -0.1165  0.5318  3.0263
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.05211  0.2283
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|
z|)
## (Intercept)          -1.35346    0.05710 -23.702 < 2e
-16 ***
## `Affected cows cm`    0.06876    0.02323  2.959  0.00
308 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Affctdcm` -0.312
```

## Subclinical mastitis predicted from blind quarters

Significant

```
summary(
  msb <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Affected cows bq`
  + (1| Farm),
              data = Hm,
              family = "poisson",
              offset = log(`Lactating herd size`))
)
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Affected cows bq` +
(1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
##          AIC          BIC    logLik deviance df.resid
##    551.0      559.4   -272.5    545.0      121
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.8168 -0.5729 -0.1036  0.4734  2.8834
##
## Random effects:
## Groups Name          Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.08363  0.2892
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|
z|)
## (Intercept)          -1.36238    0.06819  -19.98  <2e
-16 ***
## `Affected cows bq`    0.04638    0.02936   1.58   0.
114
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Affctdcbq` -0.489
```

## Multivariable model

The following variables were associated ( $P < 0.2$  in univariable models) with the proportion of cows affected by subclinical mastitis and were therefore considered in the multivariable model:

- Researchers

- Milking parlour floor cleanliness
- Post-milking area floor cleanliness
- Pre-dipping solution
- Count of cows affected by clinical mastitis per farm
- Count of cows affected by blind quarters per farms

The model parameters were directly simulated (2000 values) from the joint posterior distribution of the model (Korner-Nievergelt, et al, 2015) using the function `sim` (Gelman and Su, 2018) in the package `arm`. The Credible Interval (95%) for fixed effects was extracted from the simulated values.

```
summary(
  fmma <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Milking parlour
r floor cleanliness` +
                `Post-milking area floor cleanlin
ess` +
                `Pre-dipping solution` + `Affected
d cows cm`+
                `Affected cows bq` + Researchers
+
                (1| Farm),
  data = Hm,
  family = "poisson",
  offset = log(`Lactating herd size`),
  nAGQ = 12)
)
```

```
## boundary (singular) fit: see ?isSingular
```

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula:
## `Affected cows scm` ~ `Milking parlour floor cleanli
ness` + `Post-milking area floor cleanliness` +
## `Pre-dipping solution` + `Affected cows cm` + `A
ffected cows bq` +
## Researchers + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 164.7 201.4 -69.4 138.7 111
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.9153 -0.6685 -0.0720 0.6234 3.3214
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
```

```

## Farm (Intercept) 1.186e-16 1.089e-08
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.40835
0.10355 -13.601 <2e-16
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty 0.13422
0.09927 1.352 0.1764
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.21221
0.08888 2.388 0.0170
## `Pre-dipping solution`Liquid 0.15433
0.08666 1.781 0.0749
## `Affected cows cm` 0.06129
0.02226 2.753 0.0059
## `Affected cows bq` -0.01221
0.03048 -0.400 0.6888
## ResearchersR2 -0.21728
0.19424 -1.119 0.2633
## ResearchersR3 -0.24742
0.14916 -1.659 0.0972
## ResearchersR4 -0.20986
0.14833 -1.415 0.1571
## ResearchersR5 0.05600
0.12437 0.450 0.6525
## ResearchersR6 -0.62632
0.42030 -1.490 0.1362
## ResearchersR7 -0.07291
0.16299 -0.447 0.6546
##
## (Intercept) ***
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty *
## `Pre-dipping solution`Liquid .
## `Affected cows cm` **
## `Affected cows bq`
## ResearchersR2
## ResearchersR3 .
## ResearchersR4
## ResearchersR5
## ResearchersR6
## ResearchersR7
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `Mpfc` `P-afc` `P-s`L `Accm` `Acby`
` RsrcR2 RsrcR3 RsrcR4
## `Mpfc`lnln`D -0.042
## `Pst-afcl`D -0.229 -0.315
## `Pr-dsltn`L -0.114 0.086 -0.155
## `Affctd`ccm` -0.067 -0.172 -0.078 -0.234

```

```
## `Affctdcbq` -0.480  0.062 -0.107 -0.016 -0.563
## ReserchrsR2 -0.456 -0.106  0.030 -0.139  0.100  0.28
6
## ReserchrsR3 -0.497 -0.083  0.007 -0.229  0.180  0.25
3  0.323
## ReserchrsR4 -0.495 -0.006  0.142 -0.134  0.286  0.03
3  0.259  0.321
## ReserchrsR5 -0.466 -0.151  0.005 -0.377  0.231  0.21
2  0.350  0.431  0.348
## ReserchrsR6 -0.226  0.033 -0.017  0.014  0.029  0.12
7  0.114  0.128  0.114
## ReserchrsR7 -0.519  0.059 -0.121 -0.212  0.154  0.34
3  0.331  0.394  0.312
##
##           RsrcR5 RsrcR6
## `Mpfclnln`D
## `Pst-afcl`D
## `Pr-dsltn`L
## `Affctdccm`
## `Affctdcbq`
## ReserchrsR2
## ReserchrsR3
## ReserchrsR4
## ReserchrsR5
## ReserchrsR6  0.124
## ReserchrsR7  0.427  0.143
## optimizer (Nelder_Mead) convergence code: 0 (OK)
## boundary (singular) fit: see ?isSingular
```

```
Anova(fmma)
```

	Chisq	Df
	<dbl>	<dbl>
`Milking parlour floor cleanliness`	1.8280794	1
`Post-milking area floor cleanliness`	5.7012143	1
`Pre-dipping solution`	3.1712092	1
`Affected cows cm`	7.5794632	1
`Affected cows bq`	0.1603742	1
Researchers	8.4184481	6
6 rows		

Removing variable Affected cows bq:

```
summary(fmmb <- update(fmma, ~. -`Affected cows bq`))
```

```
## boundary (singular) fit: see ?isSingular
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula:
## `Affected cows scm` ~ `Milking parlour floor cleanli
ness` + `Post-milking area floor cleanliness` +
## `Pre-dipping solution` + `Affected cows cm` + Re
searchers + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 162.9 196.7 -69.4 138.9 112
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.8961 -0.6334 -0.0814 0.6496 3.3256
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0 0
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.42845
0.09078 -15.735 < 2e-16
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty 0.13671
0.09909 1.380 0.16767
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.20827
0.08833 2.358 0.01837
## `Pre-dipping solution`Liquid 0.15386
0.08673 1.774 0.07607
## `Affected cows cm` 0.05629
0.01842 3.056 0.00224
## ResearchersR2 -0.19483
0.18613 -1.047 0.29522
## ResearchersR3 -0.23214
0.14430 -1.609 0.10767
## ResearchersR4 -0.20798
0.14817 -1.404 0.16041
## ResearchersR5 0.06667
0.12150 0.549 0.58320
## ResearchersR6 -0.60472
0.41690 -1.451 0.14692
## ResearchersR7 -0.05031
0.15312 -0.329 0.74250
##
## (Intercept) ***
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty *

```

```

## `Pre-dipping solution`Liquid .
## `Affected cows cm` **
## ResearchersR2
## ResearchersR3
## ResearchersR4
## ResearchersR5
## ResearchersR6
## ResearchersR7
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##          (Intr) `Mpfclnln`D `Pst-afcl`D `Pr-dsltn`L `Affctdccm`
2 RsrcR3 RsrcR4 RsrcR5
## `Mpfclnln`D -0.013
## `Pst-afcl`D -0.320 -0.311
## `Pr-dsltn`L -0.138  0.082 -0.158
## `Affctdccm` -0.466 -0.166 -0.167 -0.295
## ReserchrsR2 -0.380 -0.129  0.063 -0.140  0.329
## ReserchrsR3 -0.443 -0.101  0.035 -0.232  0.404  0.27
0
## ReserchrsR4 -0.546 -0.007  0.144 -0.132  0.369  0.26
1  0.323
## ReserchrsR5 -0.425 -0.167  0.026 -0.382  0.434  0.30
9  0.399  0.348
## ReserchrsR6 -0.189  0.025 -0.004  0.016  0.122  0.08
1  0.100  0.111  0.100
## ReserchrsR7 -0.431  0.040 -0.090 -0.221  0.447  0.25
9  0.338  0.321  0.386
##          RsrcR6
## `Mpfclnln`D
## `Pst-afcl`D
## `Pr-dsltn`L
## `Affctdccm`
## ReserchrsR2
## ReserchrsR3
## ReserchrsR4
## ReserchrsR5
## ReserchrsR6
## ReserchrsR7  0.107
## optimizer (Nelder_Mead) convergence code: 0 (OK)
## boundary (singular) fit: see ?isSingular

```

Anova(fmmb)

	Chisq	Df
	<dbl>	<dbl>
`Milking parlour floor cleanliness`	1.903657	1
`Post-milking area floor cleanliness`	5.560259	1



`Pre-dipping solution`	3.146946	1
`Affected cows cm`	9.341962	1
Researchers	8.253212	6
5 rows		

Removing variable "Researchers":

```
summary(fmmc <- update(fmmb, ~. -Researchers))
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula:
## `Affected cows scm` ~ `Milking parlour floor cleanli
ness` + `Post-milking area floor cleanliness` +
## `Pre-dipping solution` + `Affected cows cm` + (1
| Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 159.1 176.0 -73.6 147.1 118
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.8050 -0.6768 -0.1637 0.6208 3.2314
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.01432 0.1197
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
##
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.53731
0.07365 -20.872 < 2e-16
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty 0.14918
0.09987 1.494 0.135235
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.20905
0.09729 2.149 0.031653
## `Pre-dipping solution`Liquid 0.17399
0.08906 1.954 0.050747
## `Affected cows cm` 0.06595
0.01834 3.596 0.000323
##
## (Intercept) ***
## `Milking parlour floor cleanliness`Dirty
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty *
## `Pre-dipping solution`Liquid .
## `Affected cows cm` ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `Mpfcl` `P-afc` `P-s`L
## `Mpfclnln`D -0.105
## `Pst-afcl`D -0.318 -0.324
## `Pr-dsltn`L -0.540 0.049 -0.175
## `Affctdccm` -0.134 -0.092 -0.098 -0.078

```

Anova ( fmmc )

	<b>Chisq</b> <dbl>	<b>Df</b> <dbl>
`Milking parlour floor cleanliness`	2.231352	1
`Post-milking area floor cleanliness`	4.617170	1
`Pre-dipping solution`	3.816593	1
`Affected cows cm`	12.931922	1
4 rows		

Removing variable "Milking parlour floor cleanliness"

```
summary(fmmd <- update(fmmc, ~. -`Milking parlour floor  
cleanliness`))
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Post-milking area fl
oor cleanliness` +
## `Pre-dipping solution` + `Affected cows cm` + (1
| Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 159.3 173.4 -74.7 149.3 119
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.8152 -0.6886 -0.1692 0.6469 3.2018
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.0134 0.1157
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.52695
0.07275 -20.989 < 2e-16
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.25130
0.09038 2.780 0.005428
## `Pre-dipping solution`Liquid 0.16848
0.08828 1.908 0.056342
## `Affected cows cm` 0.06785
0.01849 3.670 0.000243
##
## (Intercept) ***
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty **
## `Pre-dipping solution`Liquid .
## `Affected cows cm` ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `P-afc` `P-s`L
## `Pst-afcl`D -0.388
## `Pr-dsltn`L -0.534 -0.162
## `Affctdccm` -0.129 -0.111 -0.086

```

Anova( fmmnd)

Chisq Df

	<dbl>	<dbl>
`Post-milking area floor cleanliness`	7.731178	1
`Pre-dipping solution`	3.641906	1
`Affected cows cm`	13.465970	1
3 rows		

Removing variable Pre-dipping solution

```
summary(fmme <- update(fmmd, ~. -`Pre-dipping solution`  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Adaptive
## Gauss-Hermite Quadrature, nAGQ = 12) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Post-milking area fl
oor cleanliness` +
## `Affected cows cm` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 160.9 172.1 -76.4 152.9 120
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.83882 -0.65212 -0.07752 0.63661 2.87900
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.02259 0.1503
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.45354
0.06398 -22.718 < 2e-16
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.26513
0.09201 2.881 0.00396
## `Affected cows cm` 0.06654
0.02087 3.189 0.00143
##
## (Intercept) ***
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty **
## `Affected cows cm` **
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `P-afc
## `Pst-afcl`D -0.585
## `Affctdccm` -0.231 -0.077

```

Anova( fmme)

	Chisq <dbl>	Df <dbl>
`Post-milking area floor cleanliness`	8.302595	1
`Affected cows cm`	10.170771	1

## Final multivariable model: subclinical mastitis

Interactions between all significant variables were tested in the final multivariable model and we found no significance.

```
summary(  
  fmmmd.a <- glmer(`Affected cows scm` ~ `Post-milking  
area floor cleanliness` +  
                  `Affected cows cm` + (1|Farm),  
  family = "poisson",  
  data = Hm,  
  offset = log(`Lactating herd size`)  
,  
)  
)
```

```

## Generalized linear mixed model fit by maximum likeli
hood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: poisson ( log )
## Formula: `Affected cows scm` ~ `Post-milking area fl
oor cleanliness` +
## `Affected cows cm` + (1 | Farm)
## Data: Hm
## Offset: log(`Lactating herd size`)
##
## AIC BIC logLik deviance df.resid
## 540.6 551.9 -266.3 532.6 120
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -1.83696 -0.65052 -0.07517 0.63528 2.87312
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## Farm (Intercept) 0.02313 0.1521
## Number of obs: 124, groups: Farm, 62
##
## Fixed effects:
## Estimate
Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.45341
0.06405 -22.692 < 2e-16
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty 0.26460
0.09204 2.875 0.00404
## `Affected cows cm` 0.06635
0.02092 3.171 0.00152
##
## (Intercept) ***
## `Post-milking area floor cleanliness`Dirty **
## `Affected cows cm` **
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.'
0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) `P-afc
## `Pst-afcl`D -0.585
## `Affctdccm` -0.231 -0.077

```

```
Anova( fmmnd.a )
```

	Chisq	Df
	<dbl>	<dbl>
`Post-milking area floor cleanliness`	8.263935	1
`Affected cows cm`	10.055231	1



2 rows

Simulating the model (2000 times) in order to extract Credible intervals (95% CrI)

```
bsim <- sim(fmmd.a, n.sim = 2000)
```

Simulating the model parameters (2000 x):

The function `sim` from `arm` package (Gelman and Su, 2018) was used to draw random values (2000) from the joint posterior distribution of the model (Korner-Nievergelt, et al, 2015). The Credible Interval (95%) for fixed effects was extracted from the simulated values.

Source: Korner-Nievergelt, Fränzi, et al. Bayesian Data Analysis in Ecology Using Linear Models with R, Bugs, and Stan. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015.

Arm citation:

Andrew Gelman and Yu-Sung Su (2018). `arm`: Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models. R package version 1.10-1. <https://CRAN.R-project.org/package=arm> (<https://CRAN.R-project.org/package=arm>)

Simulated parameters from model:

From the simulated values, the 2.5% and 97.5% quantiles can be used for the 95% credible interval:

From: Bayesian Data Analysis in Ecology Using Linear Models with R, BUGS, and Stan (104 p).

```
CrI.fmmd <- round(apply(bsim@fixef, 2, quantile, prob =  
c(0.025,0.5,0.975)), 2)  
CrI.fmmd
```

```
##      (Intercept) `Post-milking area floor cleanline  
ss`Dirty `Affected cows cm`  
## 2.5%      -1.58  
0.08          0.03  
## 50%       -1.45  
0.26          0.07  
## 97.5%    -1.33  
0.43          0.10
```

Associations between subclinical mastitis and herd-level variables:

The predicted proportion of cows affected by subclinical mastitis (logarithm scale) was superior in farms with greater count of cows with clinical mastitis (0.07 0.03 to 0.10).

Farms with dirty post-milking area floor had greater predicted proportion of cows affected by subclinical mastitis (0.26 95% CrI 0.08 to 0.43) than farms with clean floors.

Incidence rate ratio (exponentiated coefficients):

```
exp(CrI.fmmd)
```

```
##          (Intercept) `Post-milking area floor cleanline  
ss`Dirty `Affected cows cm`  
## 2.5%      0.2059751  
1.083287          1.030455  
## 50%       0.2345703  
1.296930          1.072508  
## 97.5%    0.2644773  
1.537258          1.105171
```

Example:

The rate ratio of subclinical mastitis was 1.3 (95% CrI 1.1 to 1.5) times greater in farms with dirty floors at the post-milking area compared with farms having clean floors

Goodness of fit:

Checking overdispersion:

```
dispersion_glmer(fmmd.a)
```

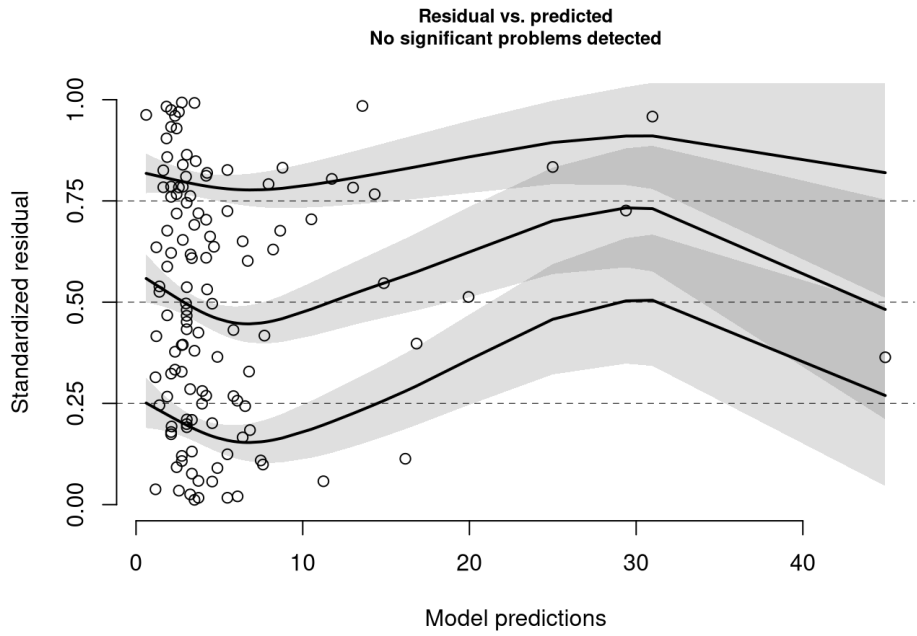
```
## [1] 1.062481
```

Simulating residuals:

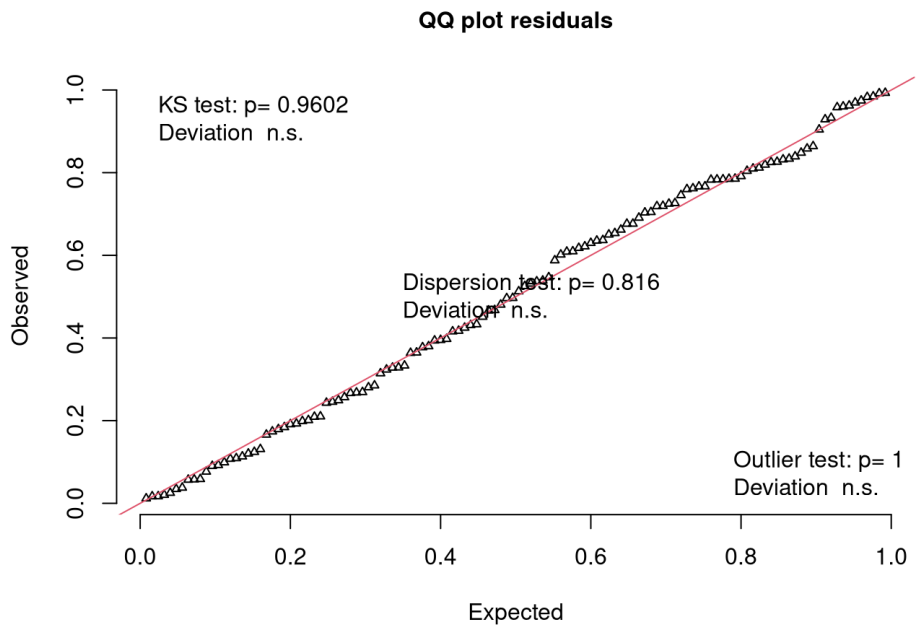
```
srfm <- simulateResiduals(fmmd.a)
```

Plotting simulated residuals:

```
plotResiduals(srfm)
```



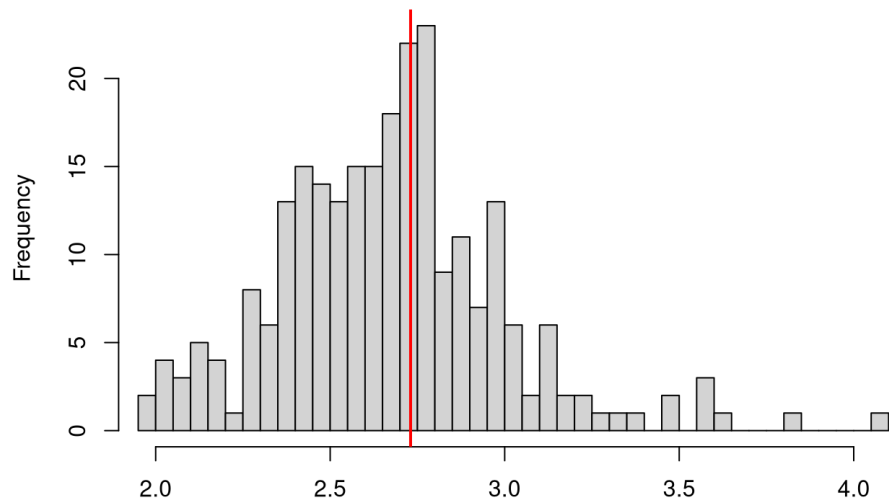
```
plotQQunif(srfm)
```



Checking overdispersion:

```
testDispersion(srfm)
```

DHARMA nonparametric dispersion test via sd of residuals fitted vs. simulated



Simulated values, red line = fitted model. p-value (two.sided) = 0.816

```
##  
## DHARMA nonparametric dispersion test via sd of residuals fitted vs.  
## simulated  
##  
## data: simulationOutput  
## ratioObsSim = 1.0216, p-value = 0.816  
## alternative hypothesis: two.sided
```

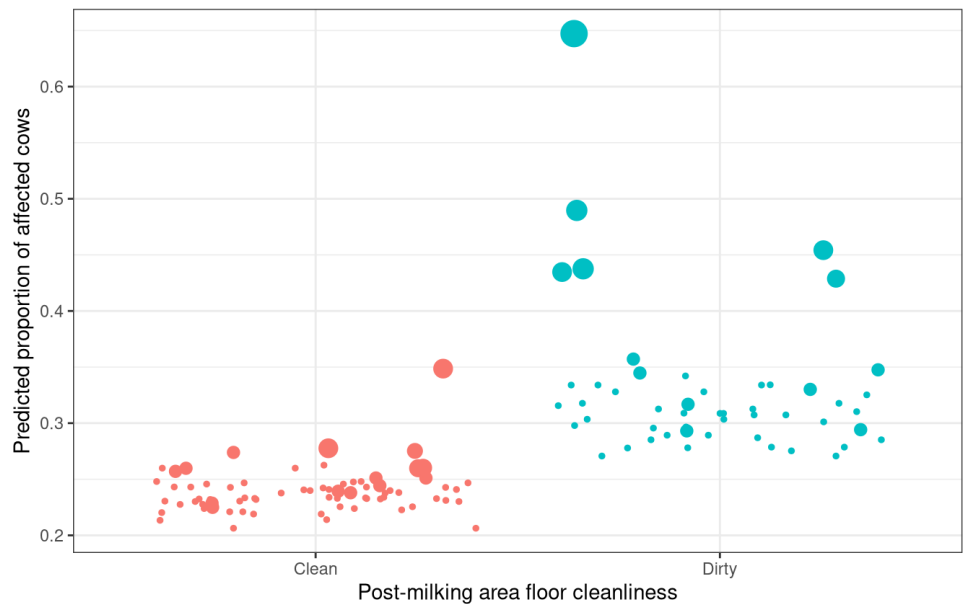
```
check_convergence(fmmd)
```

```
## [1] TRUE  
## attr(,"gradient")  
## [1] 8.202278e-06
```

Including fitted data in the dataframe and visualizing the predicted values

```
Hm %>%
  mutate(
    pred_dist_fm = fitted(fmmd.a)
  ) %>%
  ggplot(
    aes(x = `Post-milking area floor cleanliness`,
        y = pred_dist_fm / `Lactating herd size`,
        col = `Post-milking area floor cleanliness`)
  ) +
  theme_bw() +
  geom_jitter(aes(size = `Affected cows cm`)) +
  theme(legend.position = "top") +
  labs(
    x = "Post-milking area floor cleanliness",
    y = "Predicted proportion of affected cows"
  )
)
```

ected cows cm • 0.0 ● 2.5 ● 5.0 ● 7.5 ● 10.0 Post-milking area floor cleanliness • Clean



Random effect:

Intra-class correlation coefficient

```
icc(fmmd.a)
```

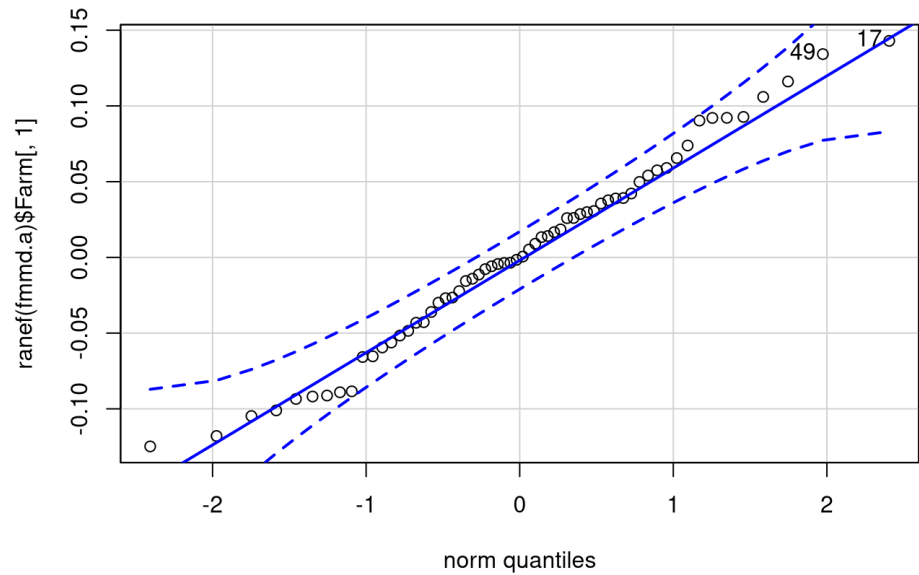
```
## Warning: Unparseable 'response' "Affected cows scm";
use is deprecated. Use as.name(.) or `..`!
## <text>:1:10: unexpected symbol
## 1: Affected cows
##      ^
```

```
## Warning: mu of 0.3 is too close to zero, estimate of
random effect variances may
## be unreliable.
```

```
## # Intraclass Correlation Coefficient
##
##     Adjusted ICC: 0.015
##     Conditional ICC: 0.014
```

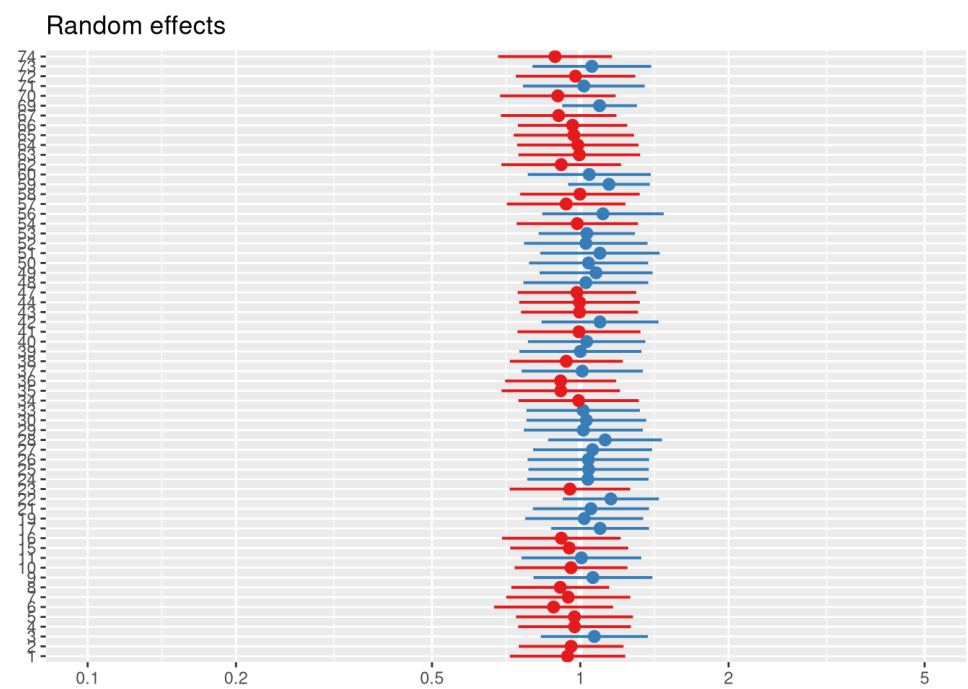
Random effect was normally distributed

```
qqPlot(ranef(fmmd.a)$Farm[,1])
```

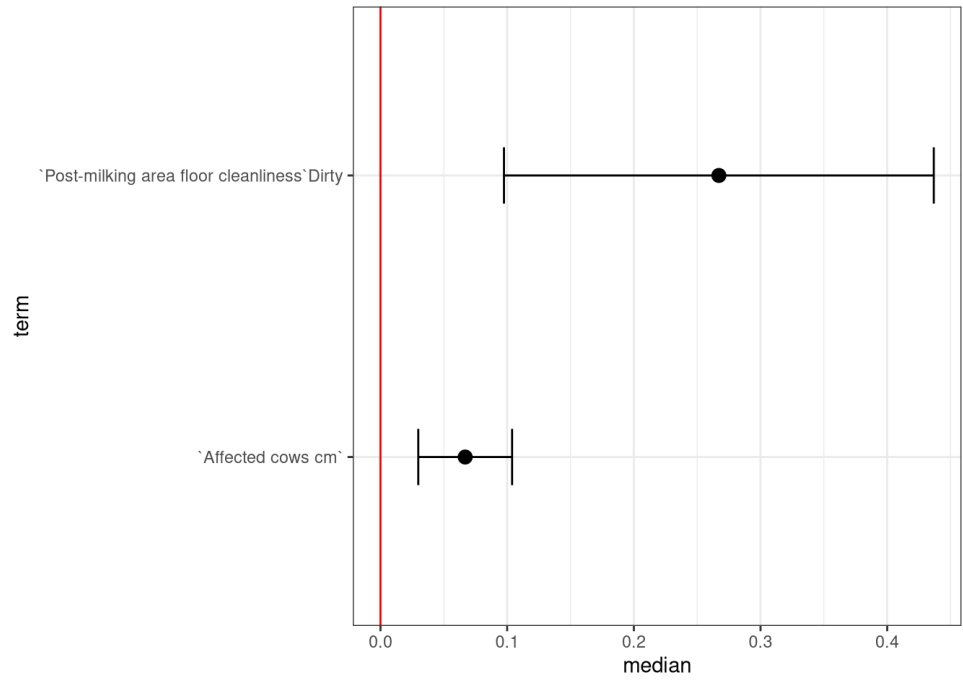


```
## [1] 17 49
```

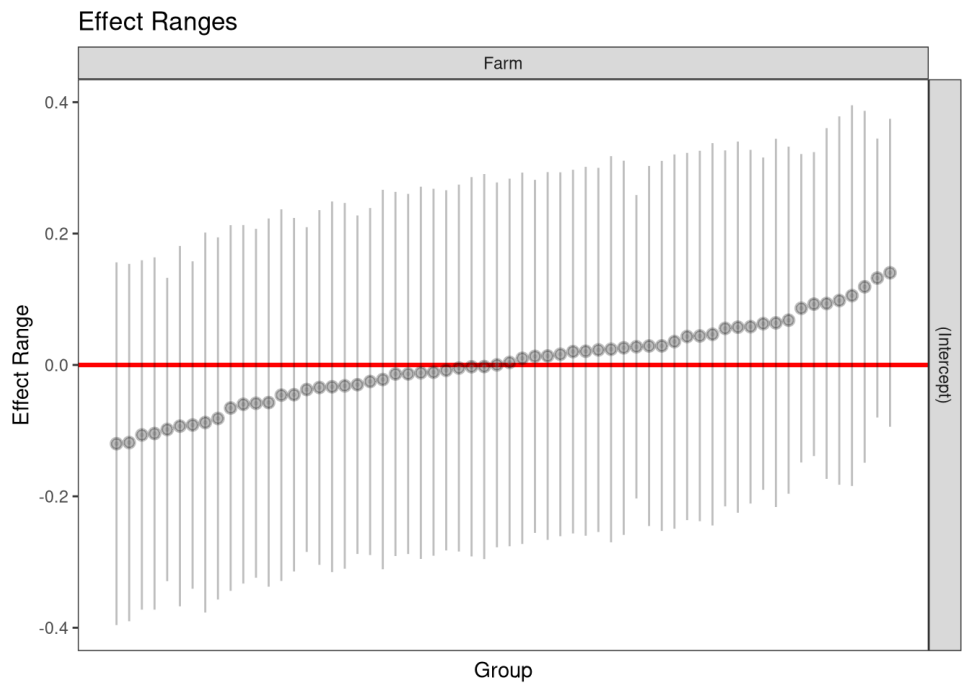
```
plot_model(fmmd.a, type = "re")
```



```
sim_d <- FEsim(fmmd.a, n.sims = 2000)
plotFEsim(sim_d)
```



```
sim_rd <- RESim(fmmd.a, n.sims = 2000)
plotRESim(sim_rd)
```

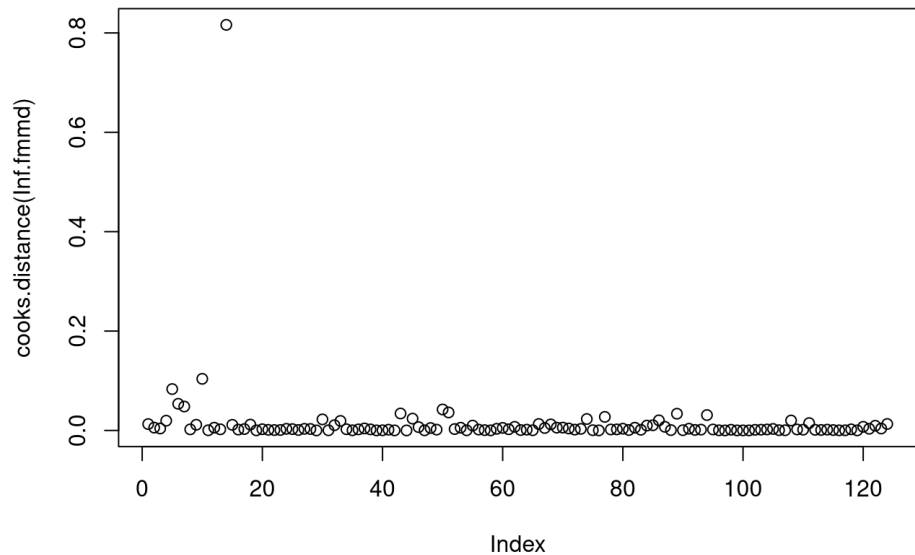


```
Inf.fmmd <- influence(fmmd.a, obs = T)
```

```
vif(fmmd)
```

```
## `Post-milking area floor cleanliness`
`Pre-dipping solution`
##                               1.043766
1.038712
##                               `Affected cows cm`
##                               1.023990
```

```
plot(cooks.distance(Inf.fmmd))
```



```
which.max(cooks.distance(Inf.fmmd))
```

```
## [1] 14
```

Point with greatest cook distance

```
Hm[14, ]
```

...	Management system	Visit	F...	n_Holstein	n_Jersey
<dbl>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
14	Freestall	Winter	69	73	2

1 row | 1-8 of 66 columns

```
dfb.fmmd <- dfbetas.estex(Inf.fmmd)
as.data.frame(dfb.fmmd)
```

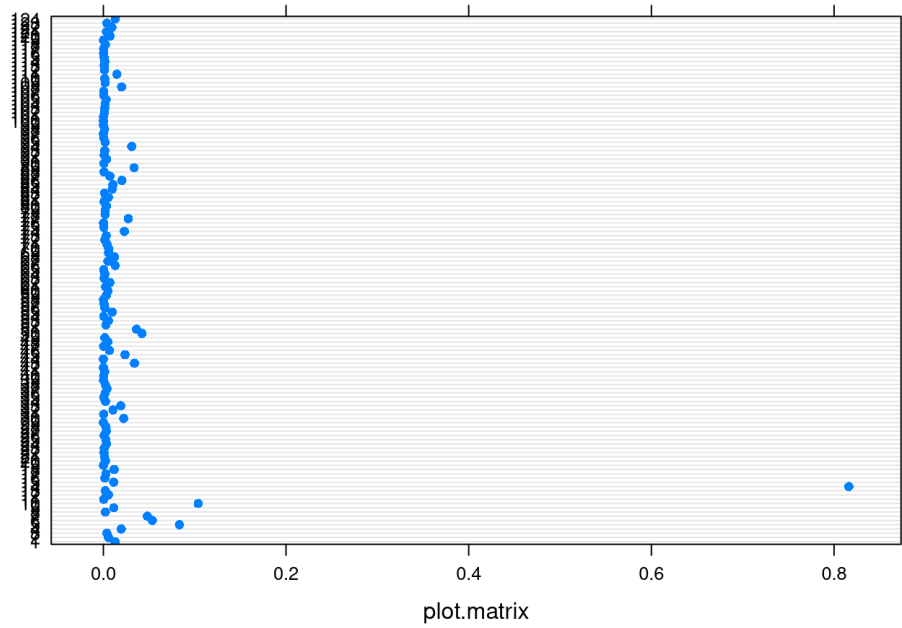
	(Intercept)	Post-milking area floor clean
	<dbl>	<dbl>
1	0.1361011296	-0.



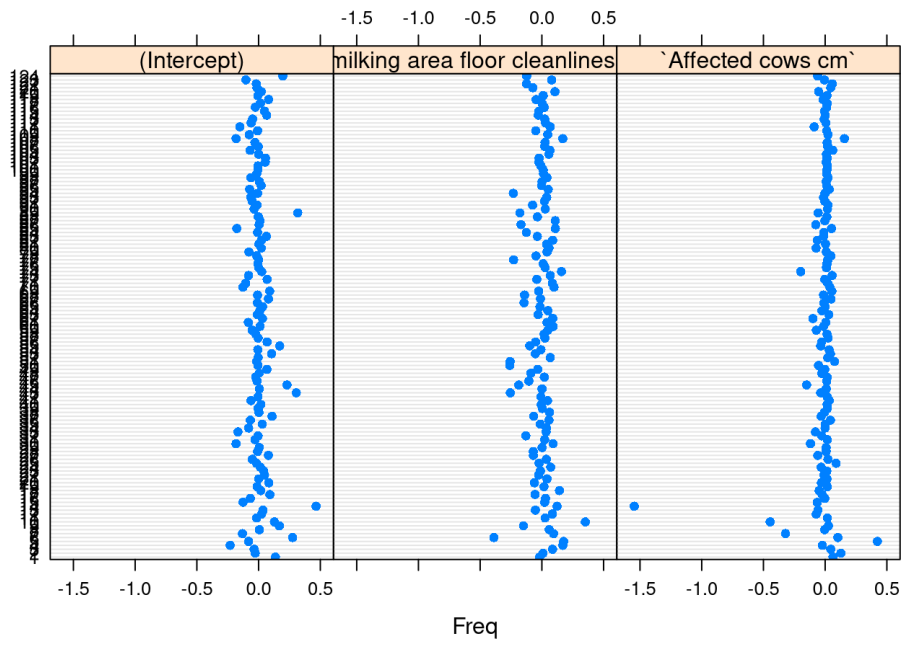
2	-0.0276275872	0
3	-0.0361139521	0
4	-0.2302472665	0
5	-0.0811558698	0
6	0.2754191244	-0
7	-0.1304229797	0
8	0.0066191157	0
9	0.1678598276	-0
10	0.1280331589	0

1-10 of 124 rows Previous **1** 2 3 4 5 6 ... 13 Next

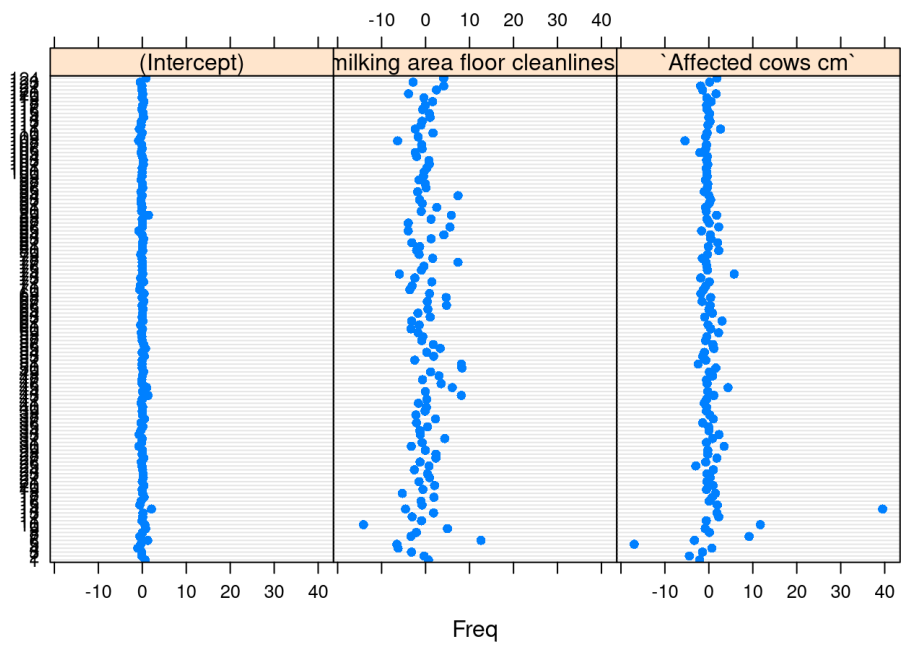
```
plot.estex(Inf.fmmd, which = "cook")
```



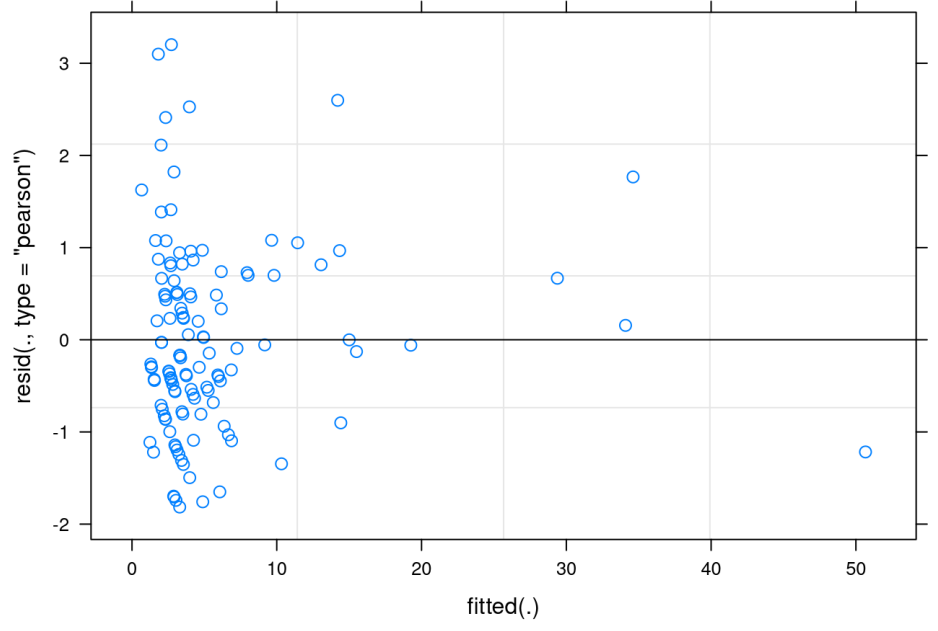
```
plot.estex(Inf.fmmd, which = "dfbetas")
```



```
plot.estex(Inf.fmmd, which = "pchange")
```



```
plot(fmmd)
```



Mixed-effects  
linear models

A null model using  
farm and cow as  
random effects

Univariable  
models

Multivariable  
model

# Thermal threshold in dairy cows affected by mastitis and lameness from herds located in the west part of santa Catarina, Brazil 2018

## Linear mixed-effects models

2020/12/17

```
library(readr)
library(dplyr)
library(car)
library(lme4)
library(ggplot2)
library(lattice)
library(tidyr)
library(epitools)
library(merTools)
library(performance)
library(arm)
```

Loading a table with three observations per cow

```
D1 <- read_csv("../data/pain/therm_thresh_mar_12_2021.csv")
```

```
## Warning: Missing column names filled in: 'X1' [1]
```

```

##
## — Column specification —————
##
## cols(
##   x1 = col_double(),
##   Town = col_character(),
##   `Housing system` = col_character(),
##   `Cow ID` = col_character(),
##   `Average temperature` = col_double(),
##   `Milking order` = col_double(),
##   `Lameness score` = col_double(),
##   `Severe mastitis` = col_double(),
##   `Lameness score_3_5` = col_double(),
##   `Lameness score_4_5` = col_double(),
##   `Unaffected cow` = col_double(),
##   Farm_ID = col_double(),
##   `Lameness category` = col_character(),
##   `Mastitis category` = col_character(),
##   `Subclinical mastitis` = col_double(),
##   `Clinical mastitis` = col_double(),
##   `Subclinical mastitis2` = col_double(),
##   Measurement = col_character(),
##   `Thermal threshold` = col_double()
## )

```

## Mixed-effects linear models

### Farms

We visited 10 confined dairy farms in 2018.

### Cows

Cows were identified and the following variables were recorded individually:

- Locomotion score based in a 5 points scale to assess the occurrence of lameness:
  - score 1 and 2 = cows without lameness
  - score 3 = cows with moderate lameness
  - scores 4 and 5 = cows with severe lameness
- Subclinical mastitis inspection by CMT reagent
- Clinical mastitis by clinical inspection of the cows

### Variables and categories

These variables were then categorized as follows and used as explanatory variables in the models:

- Lameness status of cows was categorized as:
  - Unaffected = scores 1 and 2
  - Moderate = score 3
  - Severe = scores 4 and 5

Given that we observed no differences in thermal threshold response between non-lame cows and cows with moderate lameness, this variable was recoded as follows:

- Second lameness status category:
  - non-lame and moderately lame cow
  - Cows with severe lameness (scores 4 and 5)
- Mastitis was categorized as:
  - Unaffected
  - Moderate
  - Severe

## Measurement

The thermal threshold was measured three times per cow. This variable was included in the analyses to improve model fit.

There are 501 cows with complete data for the recorded variables. Individuals were removed from this dataframe if:

- Had missing data for any variable used in the model
- Primiparous cows until 9 days after calving and multiparous cows until 11 days after calving \*\*

\*\* Dohoo, I. R. (1993). An evaluation of the validity of individual cow somatic cell counts from cows in early lactation. *Preventive Veterinary Medicine*, 16(2), 103-110.

## Thermal threshold:

The cows were stimulated by a device that applied a thermal stimulus on the skin immediately above the hoof (forelimb).

The maximum temperature that cows tolerated was recorded at the exact moment that the cows moved the limb.

The procedure was applied three times, thus there are three measurements per individual.

This variable was used as outcome in the models,

Building contrasts for mastitis categories: using unaffected cows as reference

```
D1$`Mastitis category` <- as.factor(D1$`Mastitis category`)

contrasts(D1$`Mastitis category`) <- contr.Treatment(levels(D1$`Mastitis category`),
                                                    bas
e = 3)

contrasts(D1$`Mastitis category`)
```

```
##           [T.Moderate] [T.Severe]
## Moderate           1           0
## Severe             0           1
## Unaffected         0           0
```

## A null model using farm and cow as random effects

```
summary(fm <- lmer(`Thermal threshold` ~ 1 + (1
|Farm_ID/`Cow ID`),
          data = D1))
```

```
## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ 1 + (1 | Farm_ID/`Cow
ID`)
## Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 10266.3
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.66065 -0.61355 -0.04517  0.59684  2.86631
##
## Random effects:
## Groups          Name          Variance Std.Dev.
## `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 26.201   5.119
## Farm_ID          (Intercept)  3.494   1.869
## Residual                            36.634  6.053
## Number of obs: 1503, groups: `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error t value
## (Intercept)  75.1290    0.6609   113.7
```

## Univariable models

### Mastitis

```
summary(fms <- lmer(`Thermal threshold` ~ `Mastitis cat
egory` + (1 |Farm_ID/`Cow ID`), data = D1))
```

```

## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ `Mastitis category` +
(1 | Farm_ID/`Cow ID`)
## Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 10255
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.72567 -0.60301 -0.04678  0.60412  2.80949
##
## Random effects:
## Groups          Name          Variance Std.Dev.
## `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 25.657   5.065
## Farm_ID          (Intercept)  3.465   1.862
## Residual                            36.634   6.053
## Number of obs: 1503, groups: `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error
t value
## (Intercept)              74.4433    0.6966
106.860
## `Mastitis category`[T.Moderate]  1.5329    0.7201
2.129
## `Mastitis category`[T.Severe]    1.8472    0.6960
2.654
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Mc`[T.M
## `Mctg`[T.M] -0.265
## `Mctg`[T.S] -0.262  0.279

```

## Lameness

```

summary(fml <- lmer(`Thermal threshold` ~ `Lameness cat
egory` + (1 | Farm_ID/`Cow ID`), data = D1))

```



```

## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ `Lameness category` +
(1 | Farm_ID/`Cow ID`)
## Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 10256.6
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.64906 -0.60181 -0.03541  0.58829  2.80731
##
## Random effects:
## Groups          Name          Variance Std.Dev.
## `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 25.656   5.065
## Farm_ID          (Intercept)  4.268   2.066
## Residual                            36.634   6.053
## Number of obs: 1503, groups: `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error t
value
## (Intercept)          74.9258    0.8152  9
1.914
## `Lameness category`Severe      1.6847    0.7693
2.190
## `Lameness category`Unaffected  -0.4102    0.6516  -
0.629
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Lct`S
## `Lmnctgry`S -0.360
## `Lmnctgry`U -0.436  0.423

```

Moderately lame cows had similar thermal threshold than non-lame cows, thus the variable was recoded as follows

```

summary(fml1 <- lmer(`Thermal threshold` ~ `Lameness score_4_5` + (1 | Farm_ID/`Cow ID`), data = D1))

```

```

## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ `Lameness score_4_5`
+ (1 | Farm_ID/`Cow ID`)
## Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 10258
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.63806 -0.60283 -0.04217  0.58022  2.80505
##
## Random effects:
## Groups          Name          Variance Std.Dev.
## `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 25.631   5.063
## Farm_ID          (Intercept)  4.111   2.027
## Residual                            36.634  6.053
## Number of obs: 1503, groups: `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error t value
## (Intercept)      74.7033    0.7226 103.378
## `Lameness score_4_5` 1.8844    0.6967   2.705
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## `Lmscr_4_5` -0.218

```

## Measurement

```

summary(fmm <- lmer(`Thermal threshold` ~ Measurement +
(1 | Farm_ID/`Cow ID`), data = D1))

```

```

## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ Measurement + (1 | Fa
rm_ID/`Cow ID`)
## Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 9953.5
##
## Scaled residuals:
## Min 1Q Median 3Q Max
## -3.6196 -0.5054 -0.0196 0.5534 3.3110
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 29.467 5.428
## Farm_ID (Intercept) 3.494 1.869
## Residual 26.836 5.180
## Number of obs: 1503, groups: `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
## Estimate Std. Error t value
## (Intercept) 78.5286 0.6874 114.25
## MeasurementSecond -4.0112 0.3273 -12.26
## MeasurementThird -6.1874 0.3273 -18.90
##
## Correlation of Fixed Effects:
## (Intr) MsrmnS
## MesrmntScnd -0.238
## MesrmntThrd -0.238 0.500

```

## Multivariable model

```

summary(
  fml <- lmer(
    `Thermal threshold` ~ `Lameness score_4_5` + `M
astitis category` + Measurement +
      (1 | Farm_ID/`Cow ID`), data = D1
  )
)

```

```

## Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
## Formula: `Thermal threshold` ~ `Lameness score_4_5`
+ `Mastitis category` +
##      Measurement + (1 | Farm_ID/`Cow ID`)
##      Data: D1
##
## REML criterion at convergence: 9935.8
##
## Scaled residuals:
##      Min      1Q  Median      3Q      Max
## -3.5745 -0.5132 -0.0266  0.5502  3.2973
##
## Random effects:
##      Groups          Name          Variance Std.Dev.
##  `Cow ID`:Farm_ID (Intercept) 28.515   5.340
##   Farm_ID          (Intercept)  3.966   1.991
##   Residual                                26.836   5.180
## Number of obs: 1503, groups:  `Cow ID`:Farm_ID, 501;
Farm_ID, 10
##
## Fixed effects:
##
##              Estimate Std. Error
t value
## (Intercept)          77.5406    0.7659
101.236
## `Lameness score_4_5`          1.6340    0.7016
2.329
## `Mastitis category`[T.Moderate]  1.4645    0.7170
2.043
## `Mastitis category`[T.Severe]    1.5905    0.7011
2.269
## MeasurementSecond          -4.0112    0.3273
-12.255
## MeasurementThird           -6.1874    0.3273
-18.904
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr) `Ls_4_` `Mc`[T.M `Mc`[T.S MsrnmS
## `Lmscr_4_5` -0.170
## `Mctg`[T.M] -0.232 -0.043
## `Mctg`[T.S] -0.208 -0.156  0.282
## MesrmntScnd -0.214  0.000  0.000  0.000
## MesrmntThrd -0.214  0.000  0.000  0.000  0.500

```

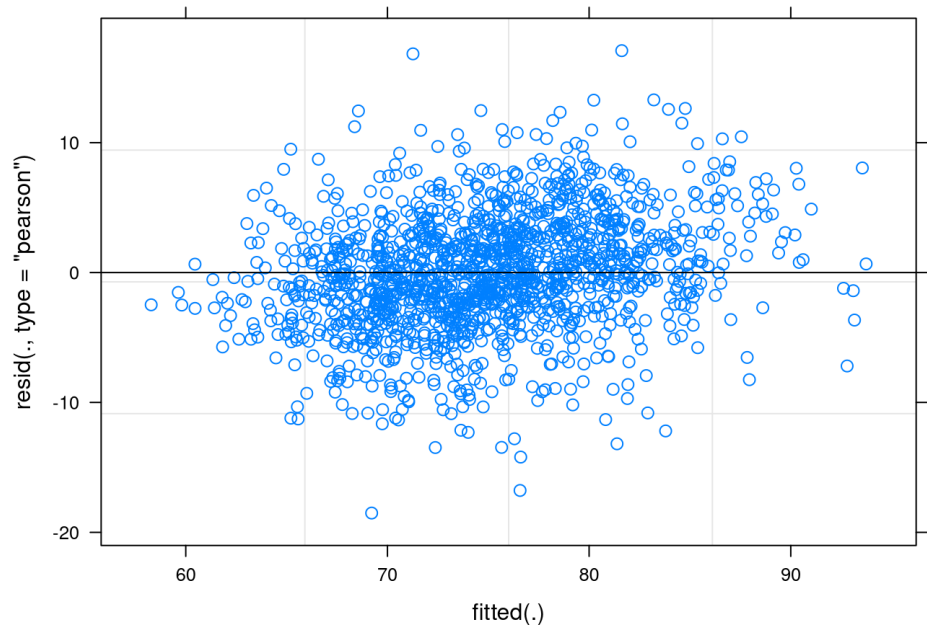
Anova( fml )

	Chisq <dbl>	Df <dbl>	Pr(>Chisq) <dbl>
`Lameness score_4_5`	5.424523	1	1.985586e-02
`Mastitis category`	7.285579	2	2.617922e-02

```
Measurement 367.840559 2 1.331795e-80
```

```
3 rows
```

```
plot(fml)
```



Simulations from the posterior distributions of the model parameters:

```
bsim.fm <- sim(fml, n.sim = 2000)
```

Coefficients

```
coef.fml <- round(apply(bsim.fm@fixef, 2, quantile, prob = c(0.025,0.5,0.975)), 3)
coef.fml
```

```
##      (Intercept) `Lameness score_4_5` `Mastitis category` [T.Moderate]
## 2.5%      76.053                0.271
## 50%      77.534                1.632
## 97.5%    79.011                2.990
##      `Mastitis category` [T.Severe] MeasurementSecond MeasurementThird
## 2.5%                0.225                -4.62
## 50%                1.574                -4.01
## 97.5%              2.917                -3.39
## 1                -5.570
```

The thermal threshold was superior in cows with severe lameness and cows with moderate (score 1 and 2 for CMT) and severe mastitis (score 3 for CMT and clinical mastitis).

Thermal threshold was highly variable changing for each measurement and, each cow had a standard deviation of 5 around the average. This suggest responses highly variable within individuals.

Intraclass correlation coefficients:

Model

```
icc(fm1)
```

```
## # Intraclass Correlation Coefficient
##
##      Adjusted ICC: 0.548
##      Conditional ICC: 0.485
```

Variance partition:

ICC for Cow ID

48% of the unknown variation in thermal threshold was associated to the individual cow

```
28.515/(28.515 + 3.966 + 26.836)*100
```

```
## [1] 48.07222
```

ICC for Farm ID 6%

```
3.966/(28.515 + 3.966 + 26.836)*100
```

```
## [1] 6.68611
```

Using the random effects improved the model fit

```
library(lmerTest)
```

```
##
## Attaching package: 'lmerTest'
```

```
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmer
```

```
## The following object is masked from 'package:stats':
##
## step
```

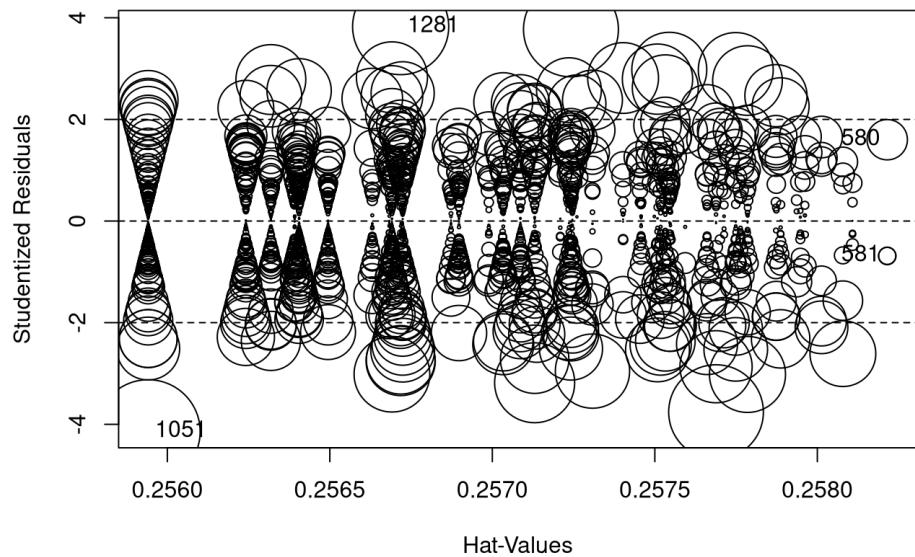
```
ranova(fm1)
```

	n...	logLik	AIC	<
	<int>	<dbl>	<dbl>	<
<none>	9	-4967.878	9953.756	
(1   `Cow ID`:Farm_ID)	8	-5150.923	10317.846	366.09
(1   Farm_ID)	8	-4987.252	9990.503	38.74

3 rows

### Influence

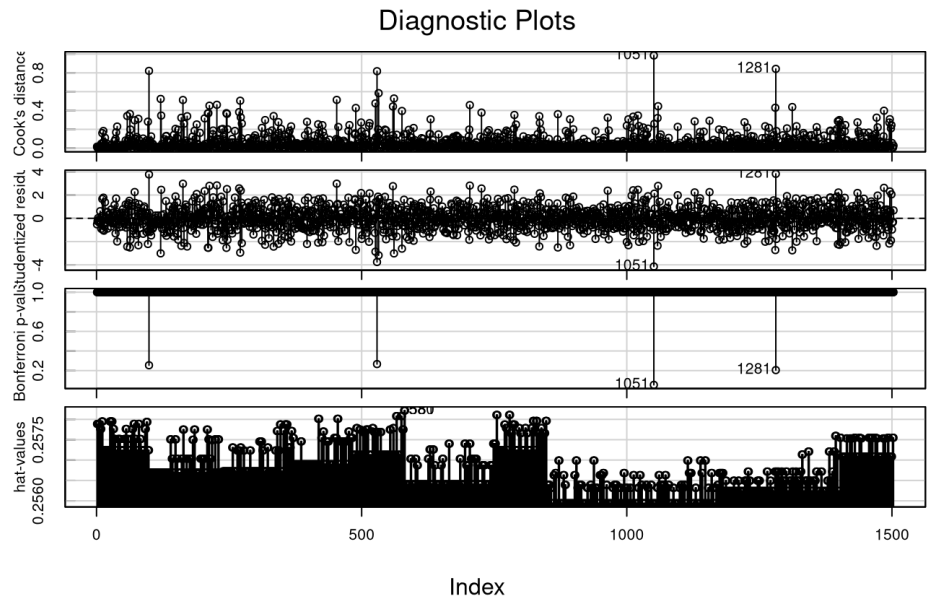
```
influencePlot(fm1)
```



	StudRes	Hat	CookD
	<dbl>	<dbl>	<dbl>
580	1.6004373	0.2582151	0.1486038
581	-0.6831978	0.2582151	0.0270798
1051	-4.1439067	0.2559411	0.9844674
1281	3.8245672	0.2567179	0.8420074

4 rows

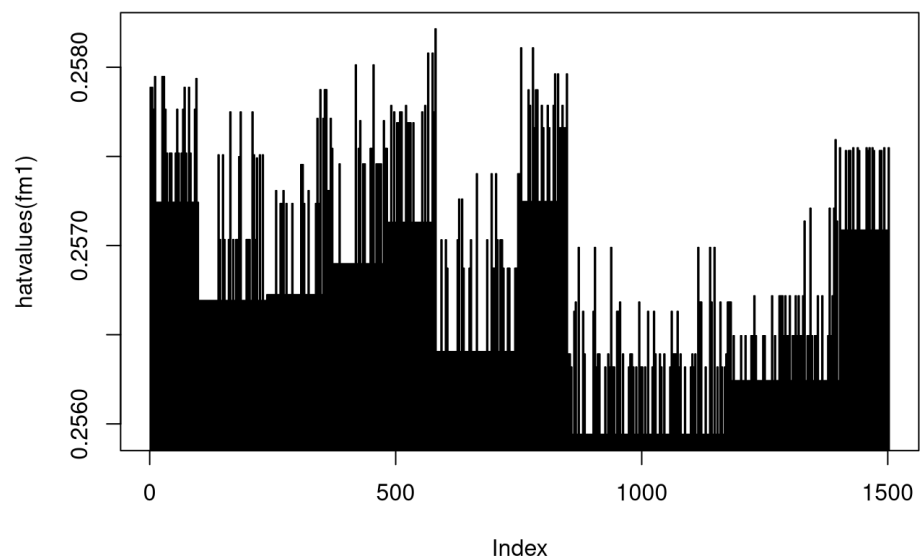
```
influenceIndexPlot(fm1)
```



```
sort(hatvalues(fm1), decreasing = TRUE)[1:11]
```

```
##          580          581          582          754          755  
756          778          779  
## 0.2582151 0.2582151 0.2582151 0.2581082 0.2581082 0.  
2581082 0.2581082 0.2581082  
##          780          565          574  
## 0.2581082 0.2580787 0.2580787
```

```
plot(hatvalues(fm1), type = "h")
```

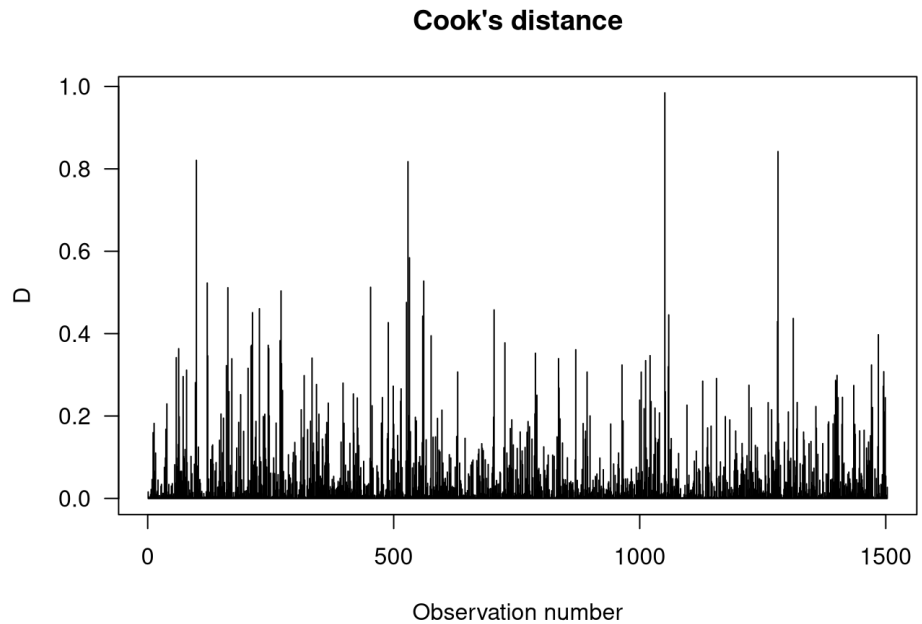




```

plot(
  cooks.distance(fm1),
  type = "h",
  main = "Cook's distance",
  ylab = "D",
  xlab = "Observation number",
  las = 1
)

```

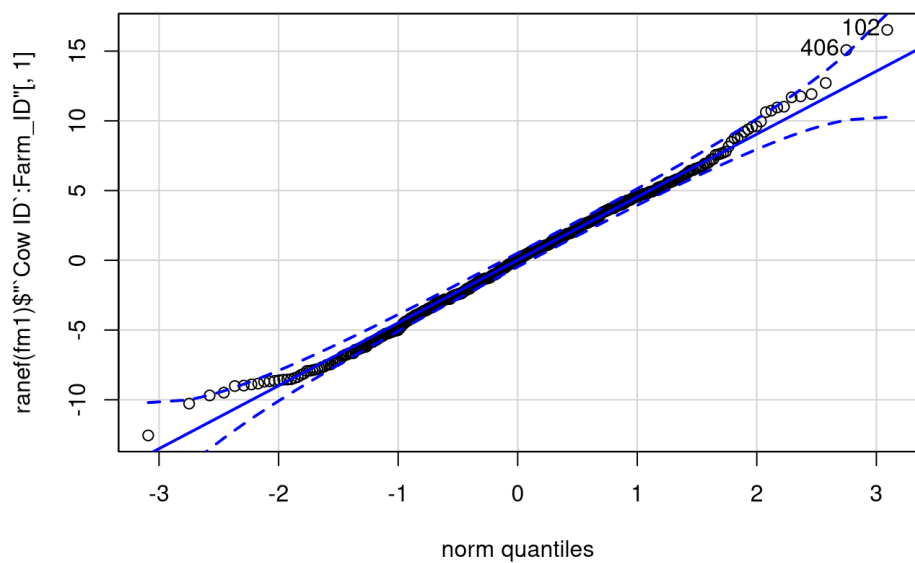


Random effect had normal distribution

```

qqPlot(ranef(fm1)$"Cow ID":Farm_ID"[,1])

```

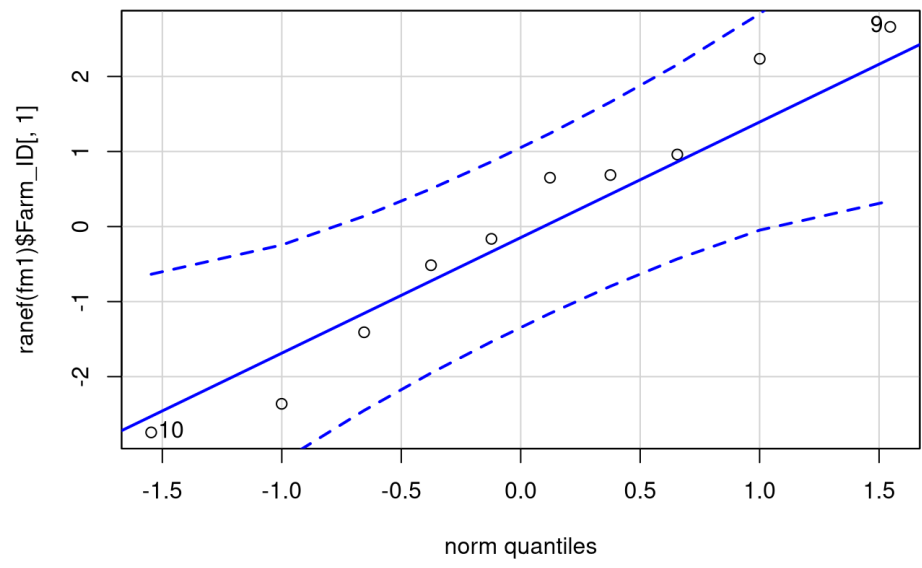


```

## [1] 102 406

```

```
qqPlot(ranef(fm1)$Farm_ID[,1])
```



```
## [1] 10 9
```