

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EDINARA SILVA DE LIMA**

**DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS:**  
**AValiação de diferentes abordagens à campo**

**LAGES, SC**

**2025**

**EDINARA SILVA DE LIMA**

**DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS:  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS À CAMPO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Sussenbach de Abreu

**LAGES, SC**

**JULHO, 2025**

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA

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

Silva de Lima, Edinara  
DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM  
PROPRIEDADES LEITEIRAS : AVALIAÇÃO DE DIFERENTES  
ABORDAGENS À CAMPO / Edinara Silva de Lima. -- 2025.  
83 p.

Orientador: André Thaler Neto  
Coorientador: Alexandre Sussenbach de Abreu  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação , Lages, 2025.

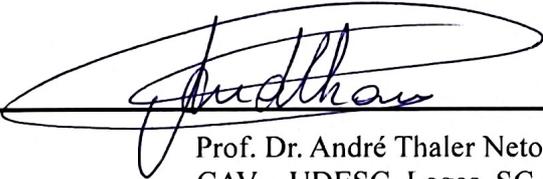
1. Métodos de diagnóstico indiretos. 2. Mastite subclínica. 3.  
Qualidade do leite. I. Thaler Neto, André. II. Sussenbach de Abreu,  
Alexandre. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação . IV. Título.

**EDINARA SILVA DE LIMA**

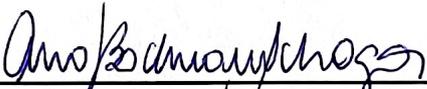
**DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS:  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS À CAMPO**

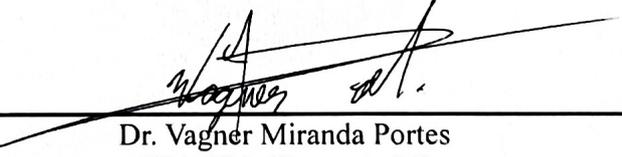
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós – Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Prof. Dr. André Thaler Neto  
CAV – UDESC, Lages, SC.

**Membros:**

  
Profa. Dra. Ana Luiza Schogor  
CEO - UDESC, Chapecó, SC

  
Dr. Vagner Miranda Portes  
EPAGRI, Chapecó, SC

Lages, 31 de julho de 2025

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço à Deus, Pai Supremo, por me permitir trilhar uma vida com propósito, por me guiar em cada passo e por conduzir meu caminho para a evolução e por colocar ao meu lado pessoas do bem, que me inspiram a cada dia.

À minha amada mãe Elisete, por me guiar em minha jornada com amor incondicional, dedicação incansável e carinho, sempre transmitindo a essência de uma verdadeira guerreira. Ao meu pai Neri, por todo o amor desde a infância e por ser essencial na formação do meu caráter. À minha querida “Tia Aidê”, minha segunda mãe, cuja presença confirma que os laços do coração vão muito além dos laços de sangue. Minha gratidão por tanto amor, carinho e cuidado é indescritível. Estarei com vocês eternamente...

À toda equipe da empresa Cow Vale, pela valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho. De modo muito especial, à Jessica Bressan e ao Alexandre Abreu, meu coorientador e um dos principais responsáveis pelo meu crescimento profissional. Sou imensamente grata pela confiança depositada em meu trabalho e por nunca medirem esforços para o meu desenvolvimento. Meu carinho, admiração e respeito por vocês são imensuráveis e eternos!

Ao meu orientador, querido professor André Thaler por instruir no desenvolvimento deste trabalho e na construção da minha jornada acadêmica. Sem dúvidas, é para mim um exemplo de profissional, sempre disposto a contribuir com o nosso crescimento. Além disso, é um verdadeiro exemplo de ser humano. Sua humildade e carisma nos mostram que o conhecimento é, de fato, o alimento para a evolução.

Aos meus amigos e segunda família em Braço do Norte: Andréia, Alexandre, Angélica, Ana e Marize por terem acolhido não só a mim, mas também a toda nossa equipe. Da mesma forma, jamais haverá palavras que possam demonstrar minha gratidão e carinho. Vocês são incríveis!

Gratidão a todos meus colegas da pós-graduação e de jornada, e de um modo muito especial à Angélica, Helen, Adriana, Carina, Ana Maria e Eduardo por serem fundamentais nesse trabalho, assim como a todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa que, de alguma forma, contribuíram.

Ao Programa de Pós-graduação – CAV/UEDESC. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, termo de Outorga N°: 2024TR002580 pelo apoio financeiro na realização do experimento.

A todos meu muito obrigada!

## RESUMO

A mastite subclínica é a enfermidade de maior prevalência em rebanhos leiteiros, comprometendo a produtividade e a qualidade do leite. A dinâmica da mastite subclínica (DMSC), baseada na contagem mensal de células somáticas (CCS), representou um avanço no diagnóstico, porém apresenta limitações ao classificar todas as vacas com CCS inferiores a 200.000 células/mL como saudáveis ou curadas. A combinação da CCS com a contagem diferencial de células somáticas (CCSD) possibilita a formação dos grupos de saúde do úbere (GSU), que identificam estágios distintos da infecção subclínica a partir de uma única análise do leite. Métodos emergentes, como a estimativa da CCS por espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE), podem oferecer alternativas para o diagnóstico da mastite. Este estudo avaliou diferentes abordagens diagnósticas para a mastite subclínica, considerando a relação entre as categorias da DMSC, os GSU, o California Mastitis Test (CMT) e fatores de risco associados. O experimento foi conduzido em duas propriedades leiteiras no Sul de Santa Catarina, com coletas mensais de leite individual, totalizando 494 amostras. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (CF) e por EBE para determinação da CCS e CCSD por CF. A DMSC foi determinada pela relação da CCS do mês anterior com a do mês atual. Os GSU foram classificados conforme dois modelos (GSU\_Bobbo e GSU\_Schwarz). O CMT foi realizado mensalmente, e em duas visitas foram avaliadas a hiperqueratose, profundidade e sujidade do úbere. A concordância entre as metodologias foi avaliada pelo coeficiente Kappa, a associação pelo teste de Qui-quadrado, e os fatores de risco por regressão logística, ambos utilizando o pacote estatístico SAS®. Os modelos GSU\_Bobbo e GSU\_Schwarz classificaram, respectivamente, 36,62% e 50,94% das vacas consideradas saudáveis pela DMSC como suscetíveis ou suspeitas, e 53,85% e 69,23% das vacas curadas foram enquadradas nessas categorias. A concordância entre a DMSC estimada por CF e EBE foi inferior a 45% para todas as categorias avaliadas. Entre os resultados negativos ao CMT, 18,48% foram classificados como novas ou infecções crônicas pela DMSC, e até 30,43% dos positivos foram considerados saudáveis ou curados. Nos GSU, parte dos resultados negativos e positivos ao CMT foram classificados divergentes, indicando limitações do CMT isoladamente. O risco de infecções crônicas aumentou progressivamente com o avanço da lactação (até OR=15,33) e maior ordem de parto (até OR=3,67). O risco de classificação mastítica nos GSU também aumentou com o DEL e a ordem de parto, enquanto o risco para categorias suscetíveis e suspeitas diminuiu com esses fatores. A utilização conjunta da CCS e CCSD permite diferenciar o diagnóstico da mastite subclínica (MSC) por meio de GSU a partir de uma única análise individual de leite,

identificando vacas susceptíveis ou suspeitas dentro dos grupos considerados sadios ou curados pela DMSC, além de identificar vacas crônicas em apenas uma análise. As categorias da DMSC apresentam concordância fraca com o GSU\_Bobbo e moderada com o GSU\_Schwarz, evidenciando que cada abordagem avalia a MSC de maneira distinta.

**Palavras-chaves:** métodos de diagnóstico indiretos; mastite subclínica; qualidade do leite.

## ABSTRACT

Subclinical mastitis is the most prevalent disease in dairy herds, impairing both productivity and milk quality. The dynamics of subclinical mastitis (DSCM), based on monthly somatic cell counts (SCC), represented an advance in diagnosis, however, it presents limitations by classifying all cows with SCC below 200,000 cells/mL as healthy or cured. The combination of SCC with differential somatic cell counts (DSCC) enables the formation of udder health groups (UHG), which identify distinct stages of subclinical infection from a single milk analysis. Emerging methods, such as SCC estimation by electrical bioimpedance spectroscopy (EBS), may provide alternatives for mastitis diagnosis. This study evaluated different diagnostic approaches for subclinical mastitis, considering the relationship between DSCM categories, UHG, the California Mastitis Test (CMT), and associated risk factors. The experiment was conducted on two dairy farms in southern Santa Catarina, with monthly collections of individual milk samples, totaling 494 samples. Samples were analyzed by flow cytometry (FC) and by EBS for SCC determination, in addition to DSCC by FC. DSCM was determined by the relationship between SCC from the previous month and the current month. UHG were classified according to two models (UHG\_Bobbo and UHG\_Schwarz). The CMT was performed monthly, and during two visits teat-end hyperkeratosis, udder depth, and dirtiness were evaluated. Agreement between methodologies was assessed using the Kappa coefficient, association by the Chi-square test, and risk factors by logistic regression, both performed with the SAS® statistical package. The UHG\_Bobbo and UHG\_Schwarz models classified, respectively, 36.62% and 50.94% of cows considered healthy by DSCM as susceptible or suspect, and 53.85% and 69.23% of cured cows were also placed into these categories. Agreement between DSCM estimated by FC and EBS was below 45% for all evaluated categories. Among negative CMT results, 18.48% were classified as new or chronic infections by DSCM, and up to 30.43% of positive results were considered healthy or cured. Within UHG, part of the negative and positive CMT results were divergently classified, indicating limitations of CMT when used alone. The risk of chronic infections increased progressively with advancing lactation (up to OR=15.33) and higher parity (up to OR=3.67). The risk of being classified as mastitic within UHG also increased with days in milk (DIM) and parity, whereas the risk for susceptible and suspect categories decreased with these factors. The combined use of SCC and DSCC allows differentiation of subclinical mastitis (SCM) diagnosis through UHG in a single individual milk analysis, identifying susceptible or suspect cows within groups considered healthy or cured by DSCM, in addition to detecting chronic cases in only one test. DSCM

categories show weak agreement with UHG\_Bobbo and moderate agreement with UHG\_Schwarz, demonstrating that each approach assesses SCM differently.

**Keywords:** indirect diagnostic methods; subclinical mastites; milk quality.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre resultados de CMT, contagem de células somáticas (CCS) e escore de células somáticas.....	38
Tabela 2 – Grupos de saúde do úbere conforme pontos de corte definidos por Bobbo <i>et al.</i> , (2020) e Schwarz <i>et al.</i> , (2020b) .....	40
Tabela 3 – Estatística descritiva das variáveis analisadas das amostras individuais de leite por infravermelho médio (IV), citometria de fluxo (CF) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE).....	43
Tabela 4 – Relação entre a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) e grupos de saúde do úbere (GSU_BOBBO), conforme Bobbo <i>et al.</i> , (2020) .....	45
Tabela 5 – Relação entre a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) e grupos de saúde do úbere (GSU_SCHWARZ), conforme Schwarz <i>et al.</i> , (2020b) .....	47
Tabela 6 – Relação entre grupos de saúde do úbere (GSU_BOBBO), conforme Bobbo <i>et al.</i> , (2020) e (GSU_SCHWARZ), conforme Schwarz <i>et al.</i> , (2020b) .....	48
Tabela 7 – Relação entre as categorias da dinâmica da mastite subclínica (DMSC) estimada por citometria de fluxo (CF) e por espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE).....	49
Tabela 8 – Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) por citometria de fluxo (CF) .....	50
Tabela 9 – Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e grupos de saúde do úbere (GSU_BOBBO) conforme Bobbo <i>et al.</i> , (2020) .....	52
Tabela 10 – Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e grupos de saúde do úbere (GSU_SCHWARZ) conforme Schwarz <i>et al.</i> , (2020b) .....	53
Tabela 11 – Valores de p e estimativas dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para novas infecções de acordo com modelos de regressão logística aplicados .....	54
Tabela 12 – Valores de p e estimativas dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para infecções crônicas de acordo com modelos de regressão logística aplicados .....	55
Tabela 13 – Valores de p e estimativas dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para GSU susceptível e mastítica conforme Bobbo <i>et al.</i> , (2020) .....	57
Tabela 14 – Valores de p e estimativas dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para GSU suspeita e mastítica conforme Schwarz <i>et al.</i> , (2020b) .....	58
Tabela 15 – Valores de p das variáveis categóricas dos modelos para determinação dos fatores de risco associados ao resultado positivo no California Mastitis Test.....	59

Tabela 16 – Estimativa dos fatores de risco para as variáveis com risco significativo para CMT positivo de acordo com os modelos de regressão logística aplicados.....	60
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Acidez Titulável
BEN	Balanço Energético Negativo
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCSD	Contagem Diferencial de Células Somáticas
CCPL	Contagem Celular de Polimorfonucleares e Linfócitos
CF	Citometria de Fluxo
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CMT_Geral	Fatores de risco para CMT positivo sem avaliações de teto e úbere
CMT_UT	Fatores de risco para CMT positivo com avaliações de teto e úbere
DEL	Dias em Lactação
DMSC	Dinâmica da Mastite Subclínica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EBE	Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica
ECS	Escore de Células Somáticas
ECS_Citom	Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS por citometria de fluxo
ECS_EBE	Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS por espectroscopia de bioimpedância elétrica
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
ETA	Estabilidade ao Teste do Álcool
FPGA	<i>Field-Programmable Gate Array</i>
FR_NOVA	Fator de risco para novas infecções intramamárias
FR_NOVA_UT	Fator de risco para novas infecções intramamárias com observações de teto e úbere
FR_CR	Fator de risco para infecções crônicas
FR_CR_UT	Fator de risco para infecções crônicas com observações de teto e úbere
FR_Suscept	Fator de risco para grupo de saúde do úbere susceptível
FR_Susp	Fator de risco para grupo de saúde do úbere suspeita
FR_Mast	Fator de risco para grupo de saúde do úbere mastítica

GSU	Grupos de Saúde do Úbere
HQ	Hiperqueratose
IA	Inteligência Artificial
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IN	Instrução Normativa
ISO	Organização Internacional de Normalização
IF-TF	Espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier
LnCCS	Contagem de células somáticas em escala logarítmica
MA	Mês Anterior
MC	Mês em Curso
mL	Mililitro
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NUL	Nitrogênio Ureico do Leite
OP	Ordem de Parto
P	Valor de P (Nível de Significância Estatística)
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PU	Profundidade de úbere
r	Coefficiente de Correlação de Pearson
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SNG	Sólidos Não Gordurosos
ST	Sólidos Totais
SU	Sujidade de úbere
TLR	Receptores do tipo <i>Toll-Like Receptors</i>
°C	Graus Celsius
°D	Grau Dornic

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 RESPOSTA IMUNE DA GLÂNDULA MAMÁRIA E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	17
2.2 IMPACTOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	18
2.2.1 Gordura.....	19
2.2.2 Proteína e caseína.....	19
2.2.3 Lactose.....	20
2.2.4 Minerais.....	20
2.2.5 Propriedades físico-químicas do leite.....	21
2.3 INDICADORES DE SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	21
2.3.1 Contagem de Células Somáticas e Contagem Diferencial de Células Somáticas.....	21
2.3.2 Dinâmica da Mastite Subclínica.....	25
2.3.3 Grupos de Saúde do úbere.....	26
2.3.4 Fatores de Risco para a Mastite Subclínica.....	28
2.3.1 Ordem de parto e estágio de lactação.....	28
2.3.2 Hiperqueratose na extremidade dos tetos.....	29
2.3.3 Sujidade da glândula mamária.....	30
2.3.4 Profundidade de úbere.....	31
2.4 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DA MASTITE SUBCLÍNICA.....	31
2.4.1 Microscopia Ótica.....	32
2.4.2 California Mastitis Test (CMT).....	32
2.4.3 Citometria de Fluxo.....	33
2.4.4 Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica.....	34
2.5 OBJETIVO GERAL.....	36
2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 DESCRIÇÃO DAS FAZENDAS.....	37
3.2 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM.....	38
3.3 CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT).....	39
3.4 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO.....	40

3.5 DINÂMICA DA MASTITE SUBCLÍNICA E GRUPOS DE SAÚDE DO ÚBERE .....	40
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 RELAÇÃO ENTRE A DINÂMICA DA MASTITE SUBCLÍNICA E GRUPOS DE SAÚDE DO ÚBERE .....	44
4.1.1 Relação entre a dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere conforme Bobbo et al., (2020). .....	45
4.1.2 Relação entre Dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere conforme Schwarz et al., (2020b).....	46
4.1.3 Relação entre grupos de saúde do úbere conforme Bobbo et al., (2020) e Schwarz et al., (2020b) .....	48
4.1.4 Relação entre a dinâmica da mastite subclínica por citometria de fluxo e por espectroscopia de bioimpedância elétrica.....	49
4.1.5 Relação entre CMT, dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere .....	50
4.1.6 Relação entre CMT e grupo de saúde do úbere, conforme Bobbo et al., (2020) .....	51
4.1.7 Relação entre CMT e grupo de saúde do úbere, conforme Schwarz et al., (2020b) .....	53
5 FATORES DE RISCO PARA AS METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA .....	54
5.1 Fatores de risco para novas infecções intramamárias.....	54
5.2 Fatores de Risco para Infecções Crônicas .....	55
5.3 Fatores de Risco para grupos de saúde do úbere susceptível e mastítica conforme Bobbo et al., (2020) .....	56
5.4 Fatores de risco para grupos de saúde do úbere suspeita e mastítica, conforme modelo de Schwarz, et al., (2020b).....	58
5.5 Fatores de Risco para a vaca ser classificada como positiva ao CMT .....	59
6 DISCUSSÃO .....	61
7 CONCLUSÃO.....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

A mastite subclínica (MSC) continua sendo um dos principais desafios da pecuária leiteira. Trata-se de uma enfermidade multifatorial, influenciada por fatores individuais e relacionados ao rebanho, que ocasiona prejuízos econômicos significativos ao longo da cadeia produtiva (Gonçalves *et al.*, 2023). A mastite subclínica não manifesta alterações visíveis no leite, úbere ou em aspectos sistêmicos, mas evidencia aumento na contagem de células somáticas (CCS), redução na produção de leite e na rentabilidade nas propriedades leiteiras (Gonçalves *et al.*, 2021), alterações na composição do leite (De Vlieghe; Ohnstad; Piepers, 2018) e redução do tempo de prateleira dos derivados lácteos (Beloti, 2015).

A principal ferramenta diagnóstica da mastite subclínica é a CCS avaliada em amostras individuais, sendo a contagem  $\geq 200.000$  células/mL um indicativo de infecção intramamária (IDF, 2013). O monitoramento da CCS, especialmente por meio de análises mensais, permite acompanhar a dinâmica da mastite subclínica (Schukken; Kremer, 1996), estimando a prevalência de vacas infectadas, a taxa de novas infecções e a persistência de infecções crônicas.

O diagnóstico da MSC também é realizado em nível de vaca através do California Mastitis Test (CMT), um teste de triagem, rápido e amplamente utilizado para o diagnóstico indireto da mastite subclínica (Ruegg, 2003). Além disso, equipamentos baseados na espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE) representam uma tecnologia promissora para a estimativa da CCS e a avaliação da qualidade do leite em tempo real (Schumacher *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços nas estratégias de controle, a mastite subclínica continua sendo a enfermidade de maior prevalência em rebanhos, com taxas superiores a 46%, sem indícios de redução ao longo do tempo (Busanello *et al.*, 2017). A identificação de fatores de risco tanto para novas infecções, quanto para as infecções crônicas, é essencial para subsidiar estratégias eficazes de prevenção e controle da mastite subclínica, com foco na redução da incidência e no aumento das taxas de cura (Cardozo *et al.*, 2015). No entanto, a utilização do ponto de corte de 200.000 células/mL como critério diagnóstico pode não ser eficaz para identificar casos em estágios iniciais, uma vez que, alterações inflamatórias são observadas em glândulas com CCS abaixo desse limiar.

Embora amplamente consolidada para o monitoramento da saúde da glândula mamária, a CCS não revela a composição celular do leite, composta por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), linfócitos, macrófagos e, em menor proporção, células epiteliais. A proporção destas células varia conforme o estado inflamatório da glândula mamária (Nickerson, 1989), sendo

que em casos de mastite, os neutrófilos PMN podem representar até 92% das células presentes no leite (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Diante dessa variação, estudos baseados na contagem diferencial de células somáticas (CCSD) têm demonstrado aumento de neutrófilos PMN e presença de patógenos mesmo em amostras com CCS abaixo de 100.000 células/mL (Schwarz *et al.*, 2011, 2020<sup>a</sup>).

A introdução recente de analisadores comerciais baseados em citometria de fluxo viabilizou a avaliação simultânea da contagem total da CCS e da CCSD no leite, definida como a soma das proporções de neutrófilos PMN e linfócitos em relação à CCS total (Damm *et al.*, 2017). A combinação desses parâmetros tem sido utilizada para formação de grupos de saúde do úbere (GSU) no diagnóstico da mastite subclínica, possibilitando identificar animais saudáveis, com infecção ativa, susceptíveis ou com infecção crônica, com base no perfil celular do leite (Bobbo *et al.*, 2020). Baseados em pontos de corte para CCS e CCSD, os modelos de GSU aumentam a sensibilidade para o diagnóstico de infecções por patógenos principais (Schwarz *et al.*, 2020; Zecconi *et al.*, 2019), possibilitando a detecção de vacas em estágios iniciais da infecção, bem como vacas em estágio crônico em uma única análise, sendo que vacas classificadas como suspeitas apresentam maior risco de exceder 200.000 células/mL na análise subsequente de CCS (Schwarz *et al.*, 2021).

A dinâmica da mastite subclínica (DMSC) representou um avanço importante no diagnóstico da mesma. No entanto, a necessidade de avaliação da CCS em meses sequenciais ainda apresenta dificuldades para produtores e técnicos, especialmente no diagnóstico em propriedades menos estruturadas. Além disso, considera todas as vacas com CCS abaixo do limiar de 200.000 células/mL como sadias ou curadas. Porém, a identificação de vacas suscetíveis ou suspeitas, pelos GSU pode representar um aprimoramento diagnóstico, necessitando, porém, mais estudos que permitam a utilização de modo seguro da metodologia em condições de campo. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes abordagens diagnósticas para a detecção da mastite subclínica, com base na concordância entre as categorias da dinâmica da mastite subclínica determinadas por citometria de fluxo ou por EBE, nos grupos de saúde do úbere e no CMT, assim como identificar fatores de risco associados a estas abordagens de diagnóstico de mastite subclínica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RESPOSTA IMUNE DA GLÂNDULA MAMÁRIA E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Os mecanismos de defesa da glândula mamária são classificados em dois grupos: o sistema imune inato ou inespecífico e o sistema imune específico ou adaptativo. O sistema imune inato inclui barreiras físicas como o esfíncter do teto e barreiras químicas como a queratina do canal do teto, lactoferrina, sistema do complemento e citocinas, além de células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células exterminadoras naturais (Chase *et al.*, 2022; Santos; Fonseca, 2019).

O esfíncter do teto constitui a primeira linha de defesa da glândula mamária, funcionando como uma barreira física contra a entrada de patógenos. É formado por músculo liso, cuja contração promove o fechamento do canal do teto, reduzindo o risco de infecção. Esse canal é revestido por epitélio escamoso estratificado, responsável pela produção de queratina, que forma um tampão protetor no lúmen do canal entre 30 minutos e duas horas após a ordenha (Cobirka; Tancin; Sláma, 2020). Uma vez que o microrganismo ultrapasse o canal do teto, entra em ação a lactoferrina, uma glicoproteína quelante de ferro presente em altas concentrações no leite, em secreções externas e nos grânulos dos neutrófilos. Essa molécula apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro contra patógenos causadores de mastite. Seu principal mecanismo de ação envolve a quelação do ferro, elemento essencial para o metabolismo bacteriano, cuja indisponibilidade inibe o crescimento e a multiplicação dos microrganismos (Chase *et al.*, 2022).

A invasão da glândula mamária por patógenos desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento de leucócitos para o local da infecção. Os microrganismos expressam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos pelas células do hospedeiro, com destaque para os *Toll-Like Receptors* (TLRs). As células epiteliais mamárias desempenham um papel central nos estágios iniciais da resposta imune, uma vez que a interação entre PAMPs e TLRs nessas células ativa vias de sinalização da imunidade inata. Este processo ocorre geralmente entre 4 e 96 horas após a exposição ao agente infeccioso, resultando na produção de mediadores inflamatórios que modulam a resposta imune local (Chase *et al.*, 2022). Além das células epiteliais, os macrófagos residentes e as células *natural killers* (NK) liberam citocinas pró-inflamatórias, moléculas do sistema complemento e peptídeos antimicrobianos.

Estas interações resultam na migração de neutrófilos polimorfonucleares liberados pela medula óssea na corrente sanguínea para o local da infecção, que atua para eliminar a infecção de forma rápida e inespecífica (Paape *et al.*, 2002). Os neutrófilos recrutados para o local da infecção fagocitam os antígenos e se estes sobrevierem, ocorre a migração de linfócitos B e T e monócitos.

Macrófagos desempenham um papel fundamental tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, atuando na fagocitose de patógenos, de detritos celulares e na apresentação de antígenos aos linfócitos, o que desencadeia a resposta imune específica. Juntamente com as células dendríticas, eles reconhecem os patógenos e promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, iniciando a ativação dos linfócitos T e B (Chase *et al.*, 2022; Santos; Fonseca, 2019; Sordillo,; Shaffer-Weaver; DeRosa, 1997). Após o reconhecimento de antígenos pelas células apresentadoras, os linfócitos T secretam citocinas que estimulam os linfócitos B, cuja principal função é a produção de anticorpos. Os linfócitos possuem receptores de membrana altamente específicos, que lhes conferem capacidade de reconhecer uma ampla variedade de antígenos e proporcionar diversidade e memória imunológica (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Além disso, são responsáveis por regular e suprimir as respostas imunes (Nickerson, 1989).

Cada tipo de célula imune contribui de maneira distinta para a resposta inflamatória, e essa atuação varia conforme o estágio da infecção ou mesmo em condições fisiológicas de glândulas mamárias saudáveis. As células imunes, juntamente com as células epiteliais da glândula, compõem a CCS do leite, considerada um dos principais indicadores e mecanismos de defesa contra infecções intramamárias (Chase *et al.*, 2022; Nickerson, 1989; Santos; Fonseca, 2019). Em vacas saudáveis, a CCS é geralmente inferior a 200.000 células/mL, sendo os macrófagos as células predominantes, representando entre 35% e 79% do total. Os linfócitos correspondem a 16%–28%, seguidos por neutrófilos (3%–26%) e células epiteliais mamárias (2%–15%) (Li *et al.*, 2014). Por outro lado, em vacas com glândula mamária infectada, a proporção destas células se altera, com os neutrófilos PMN tornando-se as células predominantes podendo representar até 92% da CCS total durante o estágio agudo da infecção (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Paape *et al.*, 2002).

## 2.2 IMPACTOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

O aumento na CCS no leite está associado à redução da produção de leite, efeito atribuído aos danos estruturais causados às células epiteliais secretoras da glândula mamária

(Alhussien; Dang, 2018). De acordo com (Gonçalves *et al.*, 2018), o ponto de corte em que a produção de leite começa a ser afetada por alterações na contagem de células somáticas transformada em logaritmo (LnCCS) foi estimado em torno de 2,52 (aproximadamente 12.400 células/mL) para vacas da raça Holandesa de rebanhos brasileiros. No entanto, as perdas na produção de leite variam de acordo com o estágio da lactação e a ordem de parto. Considerando a fase da lactação em início (5 a 19 dias), meio (110 a 124 dias) e fim (289 a 304 dias), em vacas primíparas, cada incremento na LnCCS está associado a perdas médias diárias de 0,68 kg no início, 0,55 kg no meio e 0,97 kg no final da lactação. Já em vacas de segunda e terceira lactação, as perdas são mais acentuadas, sendo de 1,47 kg e 2,22 kg no início, 1,09 kg e 1,13 kg no meio, e 2,45 kg e 2,65 kg no final da lactação, respectivamente. Os autores discutiram que a perda produtiva aumentada à medida que a lactação progride pode estar associada com o maior risco de ocorrência de casos crônicos.

### 2.2.1 Gordura

A relação entre a CCS e os teores de gordura do leite varia entre estudos devido às diferentes metodologias empregadas e aos diversos agentes etiológicos envolvidos. Em geral, a redução do teor total de gordura pode estar relacionada à diminuição da capacidade de síntese da glândula mamária (Santos; Fonseca, 2019). Por outro lado, observa-se um aumento nos ácidos graxos livres no leite de vacas com mastite, atribuído à ação de lipases leucocitárias ou da plasmina, que promovem a hidrólise das lipoproteínas da membrana do glóbulo de gordura, intensificando a lipólise (Le Maréchal *et al.*, 2011). Stocco *et al.*, (2020) verificaram que níveis elevados de CCSD resultaram em redução do teor de gordura do leite, associada ao aumento da população de neutrófilos polimorfonucleares e consequente liberação de enzimas lipolíticas. Também foi identificado um aumento na concentração de ácidos graxos com o aumento da CCSD. Pegolo *et al.*, (2023) demonstraram que infecções intramamárias subclínicas, confirmadas por isolamento bacteriológico, reduziram as proporções de ácidos graxos de cadeia curta (especialmente C4:0 e C6:0, em 14%) devido à inibição da síntese de novo, enquanto aumentaram a proporção de ácidos graxos de cadeia média, (C16:0) em 4%.

### 2.2.2 Proteína e caseína

À medida que a CCS aumenta, também se observa um acréscimo nos teores de proteína (Noro *et al.*, 2006) que resulta principalmente do aporte de proteínas plasmáticas para a

glândula mamária devido a mudança na permeabilidade da membrana alveolar mamária (Pereira *et al.*, 1999) e da resposta imune contra os patógenos causadores de mastite (Santos; Fonseca, 2019).

A caseína, principal proteína do leite, corresponde a cerca de 80% do total proteico, com concentração média de 24–28 g/L. A caseína sintetizada nas células epiteliais mamárias e secretada na forma de micelas ligadas a íons fosfato de cálcio. As principais variantes genéticas são: alfa-s1 (12–15 g/L), alfa-s2 (3–4 g/L), beta (9–11 g/L) e kappa (3–4 g/L) (Doval; Arteaga, 2021; Santos; Fonseca, 2019). A elevação da CCS compromete a coagulação e o rendimento do queijo, especialmente devido à degradação da beta-caseína por enzimas proteolíticas (Pegolo *et al.*, 2021). Bisutti *et al.*, (2023) observaram redução de 8% nos teores de alfa-s1 e beta-caseína em leites com alta CCS, atribuída à ação de proteases endógenas como a plasmina, enzimas leucocitárias e proteínas derivadas da permeabilidade alterada da barreira sangue-leite. Mattiello *et al.*, (2018) relataram redução de 5,3% no rendimento industrial do queijo colonial em leites com  $CCS \geq 500.000$  cél./mL (8,94 L leite/kg) em comparação aos com  $CCS < 500.000$  cél./mL (8,49 L leite/kg).

### 2.2.3 Lactose

Os teores de lactose do leite diminuem com o aumento da CCS (Alessio *et al.*, 2021). De forma semelhante, Danieli, (2024) verificou teores de lactose mais elevados no grupo de vacas com baixa CCS ( $4,46 \pm 0,01$ ) em comparação àquelas com alta CCS ( $4,38 \pm 0,02$ ) ( $P = 0,0002$ ). A redução do percentual de lactose no leite durante a mastite pode ser atribuída a três principais causas: (1) danos das células secretoras devido à inflamação e infecção, (2) ruptura das “tight junctions” e alterações na permeabilidade da membrana basal das células mamárias que separam o sangue e o leite, (3) ação dos patógenos da mastite, que utilizam a lactose disponível como substrato, resultando na redução do percentual de lactose e aumento do ácido láctico no leite (Costa *et al.*, 2019).

### 2.2.4 Minerais

Os minerais desempenham funções essenciais na composição do leite, e estão diretamente associados com o equilíbrio iônico, osmolaridade e estabilidade físico-química da secreção láctea (Santos; Fonseca, 2019). Os principais cátions presentes são cálcio, magnésio, sódio e potássio, enquanto os ânions predominantes incluem fosfatos, citratos e cloretos,

distribuídos entre as fases solúvel e coloidal (Nero; Carvalho, 2019). A pressão osmótica do leite, majoritariamente determinada pela lactose e pelos eletrólitos sódio, potássio e cloreto, equivale à do plasma sanguíneo (González; Dürr; Fontaneli, 2001). Entretanto, em quadros de mastite, ocorrem alterações na permeabilidade da barreira entre o sangue e o leite, promovendo aumento nas concentrações de sódio e cloreto no leite (Fox; Shook; Schultz, 1985).

De acordo com Danieli, (2024) a concentração de cloretos no leite apresentou elevação significativa em amostras provenientes de animais com alta CCS, com valores médios de  $0,922 \pm 0,02$ , em comparação a  $0,855 \pm 0,02$  em vacas com baixa CCS ( $P = 0,0121$ ).

### 2.2.5 Propriedades físico-químicas do leite

A instrução normativa (IN) 76 (BRASIL, 2018) regulamenta os parâmetros físico-químicos exigidos para a comercialização do leite cru refrigerado. Entre esses parâmetros, destaca-se a estabilidade ao teste do álcool (ETA) mínima de 72% e a acidez titulável (AT) entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico por 100 mL de leite. O potencial hidrogeniônico (pH) do leite é considerado normal quando se encontra entre 6,4 e 6,8, sendo esse parâmetro inversamente proporcional à acidez titulável. A influência da CCS sobre esses parâmetros tem sido amplamente investigada em diferentes estudos.

Machado *et al.*, (2017) observaram que a CCS elevada pode influenciar na redução da estabilidade do leite. No entanto, em uma análise de 1.760 amostras de leite de tanque visando identificar fatores associados à estabilidade do leite ao teste do álcool, a CCS não apresentou associação com o resultado do teste, indicando que a estabilidade ao teste do álcool pode ser influenciada por outros fatores distintos da CCS (Scheid, 2024).

Em análise de amostras individuais de leite de vacas, (Arruda Junior, 2018) observou relação entre baixa acidez titulável (12,21 °D), pH elevado (6,85), baixa concentração de lactose (4,10%) com a CCS elevada. Essas alterações são atribuídas ao comprometimento da permeabilidade vascular, causado por lesões inflamatórias, que resultam na perda de lactose para a corrente sanguínea e na entrada de íons, como sódio e cloretos, para o leite (Santos; Fonseca, 2019).

## 2.3 INDICADORES DE SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA

### 2.3.1 Contagem de Células Somáticas e Contagem Diferencial de Células Somáticas

A CCS do leite representa a concentração de leucócitos e células epiteliais por mililitro de leite (Chase *et al.*, 2022). Essas células, naturalmente secretadas durante a ordenha, são amplamente utilizadas como indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite em rebanhos leiteiros (Alhussien; Dang, 2018). Uma CCS de 200.000 células/mL é o limiar mais utilizado para distinguir glândulas mamárias infectadas das não infectadas, apresentando sensibilidade de 74,5% e especificidade de 89,6% (IDF, 2013; Ruegg, 2011; Schepers *et al.*, 1997).

Pantoja *et al.*, (2009) avaliaram a relação entre a CCS e a infecção intramamária no período seco, bem como o risco de mastite subclínica no primeiro controle leiteiro da lactação subsequente. A sensibilidade do ponto de corte de 200.000 células/mL para a detecção de infecção intramamária subclínica foi de 0,64 na secagem, 0,69 no pós-parto e 0,65 no primeiro teste da lactação. A especificidade, por sua vez, foi de 0,66, 0,84 e 0,93, respectivamente, para os mesmos momentos avaliados.

Neste sentido, Clabby *et al.*, (2023) investigaram a associação entre a CCS e a ocorrência de infecção intramamária subclínica em vacas oriundas de rebanhos com média mensal de CCS inferior a 200.000 células/mL. A CCS individual obtida no último controle leiteiro (entre 221 e 240 dias em lactação) foi o melhor preditor para infecção intramamária ao final da lactação. A prevalência média de infecção foi de 18,7%, com maior ocorrência em vacas primíparas (29,3%) em comparação às múltíparas (16,1%). O ponto de corte otimizado, com melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, foi de 64.975 células/mL, sugerindo a possibilidade de infecção mesmo em animais com CCS aparentemente baixa, sendo *Staphylococcus aureus* o patógeno prevalente, identificado em 84% dos casos. A maior prevalência observada em primíparas foi atribuída pelos autores à possível ocorrência de infecções no início da lactação que não foram detectadas nas avaliações iniciais, uma vez que esses animais já apresentavam CCS média de 288 mil células/mL aos 36 dias em lactação.

Ainda que a CCS seja um indicador confiável da atividade imunológica na glândula mamária, não fornece informações sobre a composição das populações celulares presentes. Essa limitação dificulta a identificação do estágio da resposta inflamatória e a compreensão da progressão da infecção intramamária (Bisutti *et al.*, 2022).

Em vacas saudáveis, os macrófagos e linfócitos correspondem, respectivamente, a 35%–79% e 16%–28% das células somáticas presentes no leite. Já os neutrófilos representam de 3% a 26%, enquanto as células epiteliais mamárias variam entre 2% e 15% (Li *et al.*, 2014). No entanto, nos estágios iniciais da infecção intramamária, a proporção de neutrófilos pode aumentar expressivamente, chegando a até 92% das células somáticas, mesmo sem elevação da

CCS total (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Paape *et al.*, 2002). Portanto, além da CCS, a avaliação das proporções relativas das populações celulares imunes no leite permite uma caracterização mais precisa do estado de saúde do úbere (Damm *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm se dedicado à CCSD como ferramenta complementar à CCS. Schwarz *et al.*, (2011) avaliaram a saúde de quartos mamários com CCS < 100.000 células/mL por meio da CCSD, utilizando citometria de fluxo para identificar linfócitos, macrófagos e neutrófilos PMN. Foram selecionadas 20 vacas, totalizando 80 amostras de quartos mamários. Destas, 65 amostras provenientes de 18 vacas apresentavam CCS < 100.000 células/mL. As 15 amostras restantes, utilizadas como grupo controle, incluíam sete quartos mamários com CCS entre 100.000 e 624.000 células/mL, de sete vacas diferentes, e oito quartos mamários com CCS entre 100.000 e 1.394.000 células/mL, provenientes de duas vacas com sinais clínicos de mastite. A CCS média dos 80 quartos avaliados foi de 85.780 células/mL (DP = 233.040 células/mL). Entre os 65 quartos com CCS abaixo do limiar, 11 apresentaram crescimento bacteriano, indicando mastite latente, mesmo com a CCS entre 7.000 a 59.000 células/mL. A fim de verificar se o estado imunológico variava dentro da faixa de CCS  $\leq$ 100.000 células/mL, os quartos mamários foram classificados em quatro grupos conforme os intervalos de CCS: grupo I ( $\leq$ 6.250 células/mL), grupo II (>6.250 a  $\leq$ 25.000 células/mL), grupo III (>25.000 a  $\leq$ 100.000 células/mL) e grupo IV (>100.000 células/mL). Os linfócitos foram predominantes nos grupos I a III (com médias de 50,61%–62,99%), enquanto os neutrófilos polimorfonucleares predominaram no grupo IV (59,68%). Os macrófagos foram, na maioria das amostras, a segunda população mais prevalente. Pilla *et al.*, (2012) também relataram percentuais de neutrófilos polimorfonucleares acima de 80% em quartos mamários com CCS abaixo de 100.000 (células/mL) com cultura microbiológica negativa, fator que foi atribuído a possíveis resultados falso-negativos na análise bacteriológica ou presença de patógenos com a liberação intermitente. Esses resultados demonstram que a CCSD pode detectar processos inflamatórios mesmo em quartos mamários com CCS dentro de limites considerados normais.

O método para mensuração simultânea da CCS e CCSD em amostras de leite individual, utilizando citometria de fluxo com o equipamento Fossomatic FC foi descrito por Damm *et al.*, (2017). A CCSD foi expressa como a soma das proporções de neutrófilos PMN e linfócitos, enquanto os macrófagos foram estimados pela diferença em relação a 100%. Como os linfócitos apresentaram proporções consistentemente baixas em toda a faixa de CCS, foram agrupados com os PMN. Amostras com CCS <400.000 células/mL apresentaram CCSD entre 34% e 79%, enquanto amostras com CCS >400.000 células/mL variaram de 53% a 89%. A CCSD aumentou proporcionalmente à CCS. Os linfócitos variaram de 0 a 19% sem correlação com a CCS ( $r =$

-0,1672;  $P < 0,01$ ). Os macrófagos variaram entre 7% e 79%, com redução proporcional ao aumento da CCS ( $r = -0,3400$ ;  $P < 0,001$ ). Os PMN variaram entre 13% e 92%, aumentando com a CCS ( $r = 0,3604$ ;  $P < 0,001$ ). Este estudo validou o método Foss CCSD como confiável, repetível e de baixo custo para análise de CCS e CCSD. Os autores relataram resultados diferentes aos descritos anteriormente para as diferentes populações de células, o que foi atribuído a diferença metodológica empregada neste trabalho, que não empregou etapas de centrifugação e lavagem das amostras.

A CCSD tem se destacado como ferramenta complementar à CCS na detecção de infecções intramamárias, apresentando correlação positiva com a CCS para todos os grupos de patógenos: principais, secundários e outros (Kirkeby *et al.*, 2020). Em um estudo conduzido em dois rebanhos, foram adotados os limiares de 200.000 células/mL para CCS e 62% para CCSD, definidos com base na experiência prévia dos autores e na proximidade com a média dos valores observados. Quando patógenos principais foram isolados, a CCS permaneceu acima do limiar por uma média de 91 e 95 dias, e a CCSD por 63 e 122 dias após a infecção nos rebanhos 1 e 2, respectivamente. Para patógenos secundários, a CCS manteve-se elevada por 63 dias em ambos os rebanhos, enquanto a CCSD permaneceu acima do limiar por 59 dias no rebanho 1 e 91 dias no rebanho 2. No caso de outros patógenos, a CCS apresentou aumento abrupto seguido de queda acentuada, com média de 47,5 dias no rebanho 1 e 63 dias no rebanho 2, e a CCSD por 32 e 91 dias, respectivamente. Os resultados evidenciaram comportamento diferente entre a CCS e a CCSD após nova infecção intramamária, indicando que a CCSD pode conter informações úteis como um indicador adicional para infecções intramamárias (Kirkeby *et al.*, 2021). Conforme Schwarz *et al.*, (2020a) percentuais de CCSD são significativamente mais elevados em amostras de vacas com infecções intramamárias causadas por patógenos principais, em comparação àquelas sem infecção ou infectadas por patógenos menores ou outros.

Zecconi *et al.*, (2023), propuseram uma nova variável denominada contagem celular de polimorfonucleares e linfócitos (CCPL/mL), calculada a partir da multiplicação entre a CCS e a CCSD. O estudo avaliou 3.084 vacas de 12 rebanhos, mensalmente durante três anos, com o objetivo de determinar a acurácia da CCPL, CCSD e CCS na identificação de vacas em risco de infecção intramamária por patógenos principais (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. uberis* e *Str. dysgalactiae*) e simular o impacto do diagnóstico precoce no número de tratamentos, por meio de um modelo baseado em árvore de decisão. A identificação dos valores de corte ótimos para identificar vacas em risco de infecção intramamária e a acurácia do diagnóstico foram obtidas pelo cálculo de curvas ROC (*Receiver Operating*

*Characteristic*). Na fase inicial da lactação (dias 5 a 16), a CCPL apresentou acurácia de 77,6% com ponto de corte de 163.500 células/mL, enquanto a CCS apresentou acurácia de 75,5% com ponto de corte de 198.000 células/mL e a CCSD de 73,6% com ponto de corte de 75,2%. No período de 17 a 43 dias, a acurácia foi de 61,6% para a CCPL com ponto de corte de 53.000 células/mL, 43,8% para a CCS com 40.000 células/mL e 56,8% para a CCSD com 68,7%. Entre os dias 44 e 300 de lactação, a CCPL apresentou acurácia de 64,3% com ponto de corte de 84.000 células/mL, a CCS de 66,0% com 140.000 células/mL e a CCSD de 70,7% com ponto de corte de 74,4%. Adicionalmente, a utilização de um modelo baseado em árvore de decisão indicou um potencial redução de aproximadamente 30% nos tratamentos intramamários no início da lactação, com diminuição da taxa de tratamento de 3,4% para 2,5%.

### 2.3.2 Dinâmica da Mastite Subclínica

A realização da CCS individual mensalmente em todas as vacas com mais de 7 dias em lactação, constitui uma prática recomendada para o diagnóstico e monitoramento eficaz da mastite subclínica. A prevalência dessa condição varia em função da incidência (número de novos casos) e da duração das infecções, podendo aumentar em rebanhos com alta incidência de novas infecções ou quando ocorrem infecções de longa duração (Santos; Fonseca, 2019).

A DMSC representa o nível de infecção em função da relação entre a CCS atual de cada vaca, comparando-se ao mês anterior em um determinado período (Schukken; Kremer, 1996). O nível de infecção do rebanho pode ser determinado pelo percentual de novas infecções, percentual de cura da infecção e percentual de infecções crônicas ao longo do tempo. Estes dados permitem uma melhor compreensão da DMSC nos rebanhos, auxiliando para estratégias de controle e prevenção (Souza *et al.*, 2011).

As vacas podem entrar no rebanho em lactação pela parição ou por compras de outros rebanhos no grupo de vacas sadias ou infectadas. Uma vaca sadia pode se tornar infectada, ou seja, uma nova infecção, enquanto vacas infectadas podem se curar e retomar ao grupo das sadias. A saída de vacas do rebanho pode ocorrer pela secagem ou descarte/morte (Santos; Fonseca, 2019).

A dinâmica da CCS pode diferir em relação as infecções intramamárias causadas por diferentes patógenos. A dinâmica inclui principalmente 2 elementos do indicador: (1) a resposta à presença de um patógeno e (2) comportamento e persistência ao longo do tempo após a infecção intramamária (Kirkeby *et al.*, 2021). Microrganismos classificados como patógenos secundários incluem *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase negativos e

micrococcos, enquanto os patógenos classificados como principais incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e coliformes. Patógenos menores geralmente induzem uma resposta de contagem de células somáticas menor do que organismos classificados como principais (Dohoo; Leslie, 1991).

As metas estabelecidas para o rebanho em relação à mastite subclínica são de menos de 15% das vacas com valores de CCS superiores a 200.000 células/mL (prevalência), e menos de 8% das vacas desenvolvendo novas infecções de mastite subclínica por mês (incidência). No primeiro mês de lactação, a meta para a prevalência é inferior a 10% para vacas de primeira lactação e inferior a 15% para vacas com duas ou mais lactações (Ruegg, 2011). A taxa de cura esperada por mês é superior a 40%, correspondendo a uma duração de infecção menor do que 2,5 meses, enquanto a taxa de vacas com mastite crônica, ou seja, apresentando CCS alta por dois meses consecutivos com relação ao número de vacas com CCS alta no primeiro mês, deve ser inferior a 10% (De Vlieghe; Ohnstad; Piepers, 2018).

Busanello *et al.*, (2017) avaliaram a prevalência e a incidência de mastite subclínica em uma ampla população de rebanhos leiteiros no Brasil durante 2011 a 2015. Os autores observaram uma prevalência média de 46,4% e uma incidência média de 0,17 novos casos por vaca por mês, o que equivale a aproximadamente 17% das vacas saudáveis desenvolvendo a infecção a cada 30,4 dias. Além disso, foi observada uma tendência crescente ao longo período estudado. Os resultados destacaram a necessidade de implementação de programas de controle da mastite em larga escala como estratégia prioritária para a melhoria da qualidade do leite no país.

A mastite é uma doença de natureza multifatorial, cuja ocorrência não pode ser explicada apenas por características individuais das vacas, mas também por fatores relacionados ao manejo e ao ambiente do rebanho. A variabilidade na suscetibilidade à infecção intramamária reflete essa complexa interação entre animal e sistema de produção. A melhoria da saúde do úbere ao nível da exploração baseia-se na redução da duração da infecção intramamária existente, e na redução da incidência de novo caso de infecção intramamária (De Vlieghe; Ohnstad; Piepers, 2018).

### 2.3.3 Grupos de Saúde do úbere

A combinação dos limites de CCS e CCSD é uma abordagem nova e mais precisa para rastrear mastite (embora a bacteriologia ainda seja o padrão ouro para definição de infecção

intramamária), pois permite distinguir entre vacas saudáveis e mastíticas, identificar vacas suscetíveis à doença e detectar vacas afetadas por mastite crônica (Bobbo *et al.*, 2020).

Um limiar para maximizar a probabilidade de diagnosticar com precisão o estado de saúde da glândula mamária através da relação entre a CCS e CCSD foi definido por (Zecconi *et al.*, 2019). O estudo considerou 4386 registros de amostras leite de quatro rebanhos leiteiros com diferenças no tamanho dos rebanhos, manejo geral e manejo de ordenha. Os dados da CCSD foram analisados pelo método de cálculo de curvas ROC, que permite identificar o limiar que fornece a maior precisão e o maior valor combinado para sensibilidade e especificidade, entre todos os limiares possíveis. Os limiares estabelecidos para o agrupamento de vacas foram CCS de 200.000 células/mL e CCSD de 66,3%, 69,2% e 69,3% para vacas com dias em lactação de  $\leq 100$  (DEL), 101–200 (DEL) e  $> 200$  (DEL), respectivamente. Esses pontos de corte estabelecidos apresentaram os seguintes resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia, respectivamente: DEL  $\leq 100$  (87,8%, 79,5% e 81%), DEL 101–200 (85%, 87,3%, 86,9%), DEL  $> 200$  (67,5%, 83,7%, 79,1%). A partir destes pontos de corte foram desenvolvidas categorias de classificação para grupos de saúde do úbere. Foram consideradas como saudáveis as vacas com CCS  $\leq 200.000$  células/mL e CCSD  $\leq$  ponto de corte. Vacas suscetíveis foram identificadas com CCS  $\leq 200.000$  células/mL e CCSD  $>$  ponto de corte. Aquelas com CCS  $> 200.000$  células/mL e CCSD  $\leq$  ponto de corte foram categorizadas como crônicas, enquanto as vacas com CCS  $> 200.000$  células/mL e CCSD  $>$  ponto de corte foram classificadas como mastíticas (Bobbo *et al.*, 2020; Zecconi *et al.*, 2019).

De forma semelhante, Schwarz *et al.*, (2020b) definiram limiares para a classificação da saúde do úbere com base na CCS e na CCSD, estruturado em quatro grupos: Grupo A – saudável/normal (CCS  $\leq 200.000$  células/mL e CCSD  $\leq 65\%$ ); Grupo B – suspeito (CCS  $\leq 200.000$  células/mL e CCSD  $> 65\%$ ); Grupo C – mastite subclínica (CCS  $> 200.000$  células/mL e CCSD  $> 65\%$ ); e Grupo D – mastite crônica/persistente (CCS  $> 200.000$  células/mL e CCSD  $\leq 65\%$ ). Os critérios para a definição destes pontos de corte foram baseados em estudos anteriores. Schwarz *et al.*, (2020a) demonstraram que a adoção do ponto de corte combinado de CCS  $\geq 200.000$  células/mL com CCSD  $\geq 65\%$  para identificação de vacas infectadas por patógenos principais aumentou a sensibilidade do diagnóstico de 78% para 92%, embora tenha ocorrido uma redução na especificidade de 87% para 66%, em comparação ao uso isolado da CCS com o limiar de 200.000 células/mL.

Considerando as mesmas categorias para os grupos de saúde do úbere, Schwarz *et al.*, (2023) destacaram que rebanhos com maior proporção de vacas sadias, são rebanhos que aplicam a maioria das medidas de prevenção e controle da mastite. Esses rebanhos também

apresentam melhor desempenho (+9% de produção de leite, +11% de longevidade, -35% de tratamentos com antibióticos) do que os rebanhos das outras categorias.

## 2.3 FATORES DE RISCO PARA A MASTITE SUBCLÍNICA

Fatores de risco correspondem a condições ou características, tanto individuais quanto coletivas, que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de enfermidades. No contexto da mastite, esses fatores podem ser agrupados em três níveis distintos: rebanho, animal e quarto mamário. No nível do rebanho, os principais elementos de risco estão relacionados ao tipo de alojamento, às práticas de higiene, ao manejo da alimentação e da ordenha, bem como aos patógenos prevalentes. Para a vaca, destacam-se como fatores relevantes a produção leiteira, as características anatômicas do úbere e dos tetos, o estágio da lactação, o número de lactações, o estado nutricional e a competência imunológica (Santos; Fonseca, 2019).

### 2.3.1 Ordem de parto e estágio de lactação

O avanço da ordem de parto é reconhecido como um fator de risco para o aumento da incidência de mastite clínica e subclínica. Esse efeito está associado, por um lado, à maior exposição a agentes patogênicos ao longo da vida produtiva da vaca e, por outro, à redução da eficiência dos mecanismos imunológicos com o envelhecimento (Santos; Fonseca, 2019). Em vacas mais velhas os neutrófilos apresentam menor viabilidade e produção de espécies oxidativas reativas do que em vacas primíparas, tornando esses animais mais vulneráveis à infecção (Chase *et al.*, 2022).

Cardozo *et al.*, (2015) constataram que vacas com quatro lactações ou mais apresentavam 1,71 vezes maior probabilidade de apresentarem um novo caso de mastite subclínica do que vacas primíparas. Além disso, vacas com três e quatro lactações apresentaram risco aumentado para mastite crônica, sendo 2,04 e 1,81 vezes maior, respectivamente, em relação às primíparas. Schunig *et al.*, (2024) observaram que a probabilidade de ocorrência de mastite subclínica aumentou com a elevação da ordem de parto. Em vacas da raça Holandesa, as razões de chance foram de 1,72, 2,77 e 3,90 para vacas com duas, três e quatro ou mais lactações, respectivamente, em comparação com vacas primíparas. Para a raça Jersey, não foram observadas diferenças significativas entre vacas primíparas e aquelas com duas lactações. No entanto, o risco aumentou aproximadamente 1,54 vezes em vacas com três lactações e 2,16

vezes em vacas com quatro ou mais lactações, quando comparadas ao grupo com duas lactações ( $p < 0,0001$ ).

À medida que a lactação avança, há um incremento progressivo na CCS e na migração de neutrófilos para o leite. Essa resposta inflamatória com o avanço da lactação é um indicativo de exposição e infecção intramária, principalmente por patógenos contagiosos (Ruegg; Pantoja, 2013; Santos; Fonseca, 2019). Schunig *et al.*, (2024) descreveram que vacas da raça Holandesa com mais de 305 dias em lactação apresentaram 1,99 vezes mais chance de desenvolver mastite subclínica em comparação àquelas com até 105 dias. Resultado semelhante foi encontrado para vacas da raça Jersey, cujo risco foi 1,97 vezes maior nas mesmas condições de dias em lactação. Cardozo *et al.*, (2015) também identificaram risco significativamente maior de mastite crônica em vacas com 101 a 200, 201 a 300 e mais de 300 dias em lactação, com chances 2,6, 5,46 e 4,41 vezes superiores, respectivamente, em comparação às vacas no início da lactação.

### 2.3.2 Hiperqueratose na extremidade dos tetos

O canal do teto constitui um dos mecanismos de defesa da glândula mamária. Esse canal é revestido por epitélio escamoso estratificado, responsável pela produção de queratina, que forma um tampão protetor no lúmen do canal entre 30 minutos e duas horas após a ordenha (Cobirka; Tancin; Sláma, 2020). Desta forma, a hiperqueratose representa uma hiperplasia do extrato córneo (camada de queratina) que reveste o canal do teto e circunda o orifício externo em uma resposta inespecífica a um estímulo crônico como um trauma superficial da máquina de ordenha (Breen *et al.*, 2006).

Dentre os fatores de risco associados à hiperqueratose, Cardozo, (2017) observou que propriedades que realizavam manutenção periódica dos equipamentos de ordenha apresentaram menor escore médio de hiperqueratose em vacas. A ordem de parto também influenciou esse parâmetro, com vacas em segunda e terceira lactação apresentando escores médios superiores aos observados em primíparas. Além disso, foi identificada associação com o estágio de lactação, sendo que vacas com mais de 101 dias em lactação apresentaram maior grau de hiperqueratose em comparação às que estavam nos estágios iniciais.

Segundo Mein *et al.*, (2001), a hiperqueratose da extremidade dos tetos resulta de efeitos de longo prazo, com manifestação típica entre 2 a 8 semanas. A avaliação dos efeitos do manejo de ordenha e do equipamento sobre o tecido córneo pode ser realizada por inspeção visual da extremidade dos tetos, utilizando os seguintes escores: 1 – sem anel, 2 – anel liso ou levemente áspero, 3 – anel áspero e escore 4 – anel muito áspero.

A hiperqueratose constitui um fator de risco para a mastite subclínica, e aumentou em 1,59 vezes o risco para novos casos de mastite subclínica em vacas com pontuação média acima de 3, com relação à categoria de referência, escore 1. Neste estudo, a falta de manutenção regular dos equipamentos de ordenha aumentou o risco de casos crônicos de infecção intramamária (Cardozo *et al.*, 2015). De acordo com a revisão sistemática conduzida por (Pantoja *et al.*, 2020) apenas a forma grave de hiperqueratose (escore 4) está significativamente associada à ocorrência de mastite subclínica, sendo considerada fator de risco para infecções intramamárias causadas por patógenos contagiosos, especialmente *Staphylococcus aureus*.

### 2.3.3 Sujidade da glândula mamária

O ambiente é uma das principais causas de infecção intramamária em rebanhos mantidos em confinamento ou em sistemas de pastagem, sendo que os dois principais determinantes para a ocorrência da infecção intramamária são o contato com o patógeno e a competência imunológica dos animais.

As principais fontes de contaminação da extremidade dos tetos são os materiais da cama, esterco e lama, que favorecem a infecção da glândula mamária principalmente por coliformes e estreptococos ambientais (Reinemann; Cook, 2007). Um modelo para avaliação da sujidade da glândula mamária foi descrito por Schreiner; Ruegg, (2002), atribuído a uma pontuação baseada nas seguintes categorias: 1 (totalmente limpo); 2 (levemente sujo); 3 (a maior parte suja); e 4 (totalmente coberto com sujidade).

A higiene das vacas está diretamente associada à ocorrência de mastite subclínica, com maior risco de infecções intramamárias por patógenos principais em vacas com úberes classificados como sujos, em comparação àquelas com úberes limpos (Ruegg, 2003). Cardozo *et al.*, (2015) relataram que vacas com úberes classificados como “muito sujos” apresentaram 1,53 vezes mais chances de desenvolver mastite subclínica em relação às vacas com boa higiene do úbere. De forma semelhante, Chetri *et al.*, (2024) avaliaram os escores de higiene do úbere, flanco e pernas em vacas leiteiras e identificaram associação significativa entre maior sujidade e aumento da contagem de células somáticas. A prevalência de mastite subclínica foi de 46,2%, sendo os maiores riscos observados em vacas classificadas com escore “sujo”. Além disso, a carga bacteriana de patógenos contagiosos e ambientais, aumentou conforme pioravam os

escores de higiene, destacando a importância do manejo higiênico na prevenção da mastite e na manutenção da qualidade do leite.

#### 2.3.4 Profundidade de úbere

A profundidade do úbere constitui um fator de risco associado às características individuais da vaca, estando associada a uma maior suscetibilidade à mastite. Úberes posicionados mais próximos ao solo favorecem o contato das extremidades dos tetos com microrganismos ambientais, aumentando o risco de infecção intramamária (Coentrão *et al.*, 2008). Segundo Córdova, (2016) o aumento da profundidade de úbere apresentou influência negativa sobre a efetividade de limpeza e higienização dos tetos, bem como na saúde de glândula mamária, quando avaliados em sistemas de ordenha robótica.

A profundidade do úbere pode ser estimada por meio da avaliação da distância do assoalho do úbere até a linha do jarrete, usando uma escala de 1 a 3 (1 - assoalho do úbere acima da linha do jarrete, 2 - assoalho do úbere na linha do jarrete, 3 - assoalho do úbere abaixo da linha do jarrete). Animais com a base do úbere abaixo ou junto ao jarrete apresentaram 1,73 vezes mais chances de terem a CCS acima de 200.000 células/ml que os animais com a base do úbere acima do jarrete. Essa maior suscetibilidade pode estar relacionada ao aumento da exposição das extremidades dos tetos a microrganismos ambientais (Coentrão *et al.*, 2008). Cardozo *et al.*, (2015) verificaram que o risco para novas infecções intramamárias aumentou 1,66 e 2,42 vezes para vacas com o úbere no jarrete e abaixo da linha do jarrete, respectivamente, em comparação com vacas com o úbere acima da linha do jarrete. Além disso, o risco para infecções crônicas aumentou 1,4 vezes mais para vacas com úbere abaixo do jarrete.

#### 2.4 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DA MASTITE SUBCLÍNICA

A avaliação da CCS e sua concentração no dia do teste é o indicador mais comum de mastite subclínica e a abordagem de vigilância primária da mastite em todo o mundo (Ebrahimie *et al.*, 2018). A metodologia usada pela Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) para a contagem de células somáticas, é a citometria de fluxo, segundo a *International Organization for Standardization ISO 13366-2* (2006), ancorado por calibração ao método ISO 13366-1

(2008) (método de referência). Outras metodologias também são empregadas para avaliar a CCS e, conseqüentemente embasar o diagnóstico de mastite subclínica, direta ou indiretamente.

#### 2.4.1 Microscopia Ótica

A microscopia ótica é considerada o método de referência para a contagem de células somáticas no leite bovino, segundo estabelecido pela norma ISO 13366-1 (2008). Essa técnica é utilizada para o preparo de amostras-padrão e a determinação de valores de referência necessários à calibração de métodos mecanizados e automatizados. A metodologia para o preparo de lâminas foi padronizada por Prescott; Breed, (1910). O procedimento baseia-se na distribuição de uma gota da amostra de leite sobre uma lâmina de vidro. Após a secagem e fixação a coloração realizada com azul de metileno, que se adere ao DNA nuclear das células, permitindo a diferenciação dos demais componentes do leite e a contagem em microscopia ótica. Ao longo dos anos diferentes corantes foram avaliados para avaliação celular, como a hematoxilina e eosina com a mesma eficiência das colorações a base de azul de metileno (Zuffo, 2021).

#### 2.4.2 California Mastitis Test (CMT)

O CMT foi descrito por Schalm; Noorlander, (1957) como um método rápido para a detecção de mastite, sendo baseado na reação entre o leite e um reagente contendo detergente aniônico neutro, em que o grau de precipitação resultante está diretamente associado à contagem de células somáticas, permitindo uma estimativa qualitativa da CCS (Ruegg; Reinemann, 2002). O reagente promove o rompimento das membranas das células presentes no leite, liberando o DNA que possui alta viscosidade. O resultado é expresso em escores de acordo com a viscosidade da mistura de leite e reagente: negativo, traços, uma, duas ou três cruces (Santos; Fonseca, 2019). Conforme Constable *et al.*, (2017) a relação entre o escore de CMT, presença de reação ou viscosidade e CCS (x1000 células/ml) é descrita da seguinte forma: escore zero (ausência de reação ou viscosidade) — CCS de 0 a 200 (x1000 células/ml); escore traços (leve viscosidade) — CCS de 150 a 500 (x1000 células/ml); uma cruz (reação leve a moderada) — CCS de 400 a 1.500 (x1000 células/ml); duas cruces (viscosidade moderada) — CCS de 800 a 5.000 (x1000 células/ml); três cruces (viscosidade intensa) — CCS acima de 5.000 (x1000 células/ml).

Para o diagnóstico de mastite, Barnum; Newbould, (1960) desenvolveram uma pesquisa na qual amostras de leite de quartos mamários foram avaliadas utilizando 3 ml de leite e 3 ml de reagente, relacionando com presença de infecção por meio de cultura bacteriana. Mais de 97 % das amostras que foram negativas para o CMT eram oriundas de quartos mamários não infectados. No entanto, o teste pode apresentar limitações com possíveis falsos positivos ou negativos em vacas no pós parto ou imediatamente antes da secagem. Além disso, o teste está sujeito ao erro humano, devido a interpretação subjetiva dos resultados (Stanek; Zolkiewski; Janús, 2024).

Diferentes estudos relatam valores variados para sensibilidade e especificidade ao utilizar o CMT para diagnosticar mastite subclínica ou infecção intramamária em quartos de vacas leiteiras em distintos estágios de lactação (Kendeel *et al.*, 2019). Uma pesquisa na qual amostras de leite coletadas no terceiro dia após o parto que apresentaram qualquer resultado positivo no CMT foram submetidas à cultura microbiológica para identificação do agente etiológico. Com base nesse protocolo, os valores de sensibilidade e especificidade para a detecção de infecções intramamárias foram, respectivamente, de 56,7% e 56,2% para qualquer patógeno, 66,7% e 54,8% para patógenos principais, e 49,5% e 56,2% para patógenos menores (Sargeant *et al.*, 2001). Independentemente do ponto de corte usado, Middleton *et al.*, (2004) obtiveram valores para a sensibilidade e especificidade do escore CMT de  $\leq 0,50$  e 0,73, respectivamente.

#### 2.4.3 Citometria de Fluxo

O princípio da citometria de fluxo baseia-se na dispersão da luz e na emissão de fluorescência geradas quando um feixe de excitação incide sobre partículas em movimento. A dispersão da luz está diretamente relacionada às características estruturais e morfológicas das células, enquanto a fluorescência, emitida após excitação por laser, permite a identificação de componentes celulares específicos (Adan *et al.*, 2017). Existem dois tipos principais de citômetros de fluxo: classificadores e não classificadores. Os não classificadores apenas detectam os sinais de dispersão e fluorescência, enquanto os classificadores, além da detecção, possuem a capacidade de isolar e separar células fluorescentes de populações celulares mistas (Wilkerson, 2012).

Para avaliação da contagem de células somáticas e contagem bacteriana do leite, são utilizados citômetros classificadores. A citometria de fluxo oferece uma contagem rápida e precisa da contagem de células somáticas do leite (Feng; Zheng, 2005). As amostras a serem

analisadas quanto a CCS seguem protocolos que envolvem a adição de corantes fluorescentes como brometo de etídio, iodeto de propídio ou laranja de acridina. As células somáticas são contadas de acordo com a quantidade de DNA nuclear no citômetro de fluxo e permite a contagem de um grande número de células somáticas em um determinado período de tempo, eliminando variações nos resultados relacionadas à habilidade do operador (Pelvan; Unluturk, 2015).

Além da CCS por citometria de fluxo, uma técnica amplamente utilizada, o é método FOSS DC para a avaliação simultânea da CCSD (Damm *et al.*, 2017). O método baseia-se na diluição de um corante específico (Foss DC) na proporção de 1:10 com seu respectivo diluente para formar o reagente de trabalho. A CCSD reflete a proporção de leucócitos no leite, principalmente neutrófilos PMN e linfócitos, expressa em porcentagem. Os macrófagos são calculados pela diferença, subtraindo a CCSD (PMN e Linfócitos) de 100%. A combinação de coloração celular específica, citometria de fluxo e a análise das propriedades individuais de fluorescência das células permite a determinação simultânea de CCS e CCSD. Em uma primeira etapa, sinais de emissão de fluorescência de dois canais são utilizados para a determinação da CCS total, separando as células somáticas de outros componentes do leite. Em uma segunda etapa, apenas as células somáticas identificadas são investigadas em um gráfico de pontos com maior ampliação. Essa análise aprofundada permite a diferenciação entre macrófagos e o agrupamento de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos, que aparecem em um grupo separado.

#### 2.4.4 Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica

A impedância elétrica é definida como a oposição oferecida por um material à passagem de corrente elétrica entre dois pontos, sendo expressa como a razão entre a tensão aplicada e a corrente resultante. Na bioimpedância, investigam-se as propriedades elétricas passivas dos tecidos biológicos, que atuam em oposição ao fluxo de corrente elétrica. As medições são realizadas por meio de eletrodos metálicos e são dependentes da frequência da corrente aplicada (Grimnes; Martinsen, 2015).

Um organismo vivo é composto por fluidos intra e extracelulares que atuam como condutores elétricos, e as membranas celulares que agem como condensadores elétricos. Em frequências baixas, cerca de 100 kHz, a corrente elétrica flui predominantemente através dos fluidos extracelulares, enquanto em frequências mais elevadas, entre 500 e 800 kHz, a corrente circula tanto nos fluidos extracelulares quanto nos intracelulares (Lukaski *et al.*, 1985). As

membranas celulares determinam como a corrente flui dentro da célula. Estas membranas são compostas principalmente por proteínas e lipídeos insolúveis em água, o que caracteriza as membranas como altamente resistivas (Bertemes-Filho, 2018). Segundo Veiga, (2013) com a variação da frequência, a corrente segue caminhos diferentes, possibilitando identificar os diferentes elementos que compõe o material em estudo.

A bioimpedância elétrica caracteriza-se como uma tecnologia promissora por oferecer medições rápidas, minimamente invasivas e de baixo custo, sendo aplicada na caracterização e predição da composição corporal de animais domésticos, bem como na avaliação da qualidade do leite cru bovino (Schumacher *et al.*, 2021). Na indústria de alimentos, a EBE tem sido utilizada para estimar a composição tecidual de carcaças (Moro *et al.*, 2019). No contexto da qualidade do leite, a EBE tem demonstrado potencial na detecção de adulterações com diferentes substâncias, evidenciando sua aplicabilidade industrial (Veiga *et al.*, 2017).

Estudos realizados por Veiga; Bertemes-Filho, (2012), desenvolveram um sistema para a análise dos espectros de impedância e condutividade do leite, estabelecendo uma relação entre as amostras e o teor de gordura. Os resultados demonstraram uma diferença de aproximadamente 7,9% na condutividade entre o leite integral e o semi-desnatado, e 15,9% entre o desnatado e o semi-desnatado, evidenciando que a mudança no teor de gordura do leite pode ser significativamente detectada por medições de espectros de impedância e condutividade. Scandurra *et al.*, (2022) submeteram amostras de leite comercial pasteurizado em temperatura ultra-alta (UHT) à análise de bioimpedância para a classificação dos diferentes tipos de leite, incluindo integral, parcialmente desnatado, sem gordura e sem lactose. O método se mostrou eficaz na identificação de leite sem lactose e na discriminação dos diferentes tipos de leite dentro da mesma marca.

Veiga, (2013) utilizou a técnica de espectroscopia de impedância elétrica baseado em *Field-Programmable Gate Array* (FPGA), que possibilita análise em tempo real, para gerar sinais senoidais na faixa de frequência de 0,1 a 500 kHz. Foram analisadas amostras de leite com diferentes valores de CCS e adulterado com peróxido de hidrogênio, com o objetivo de identificar alterações no comportamento do espectro de impedância. O método demonstrou que o espectro de fase é sensível a CCS em baixas frequências, comprovando que a medição em tempo real com arquitetura baseada em FPGA pode ser utilizada para projetar sistemas de EBE.

Breitenbach, (2021) correlacionou a EBE com a espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (IF-TF) para análise da composição do leite, incluindo gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e nitrogênio ureico do leite (NUL). A CCS foi obtida por citometria de fluxo. Para avaliar a evolução da

tecnologia de EBE, foram testadas cinco versões de modelos de calibração baseados em inteligência artificial (IA), considerando até 28 frequências entre 0,8 e 1000 kHz. Quando os dados não foram estratificados por DEL e OP, a CCS apresentou coeficientes de correlação de Pearson variando entre 0,12 e 0,34 nas diferentes versões testadas. Por outro lado, lactose e EST demonstraram correlações mais elevadas, com valores entre 0,50 e 0,60 em todas as versões avaliadas, indicando potencial para o uso da técnica.

Zuffo, (2021) correlacionou metodologias para estimar células somáticas e a composição do leite bovino. A composição foi avaliada utilizando metodologias de referência descritas pelas normas ISO: gordura pelo método de Gerber, proteína pelo método de micro-Kjedahl e EST pelo método gravimétrico. O ESD foi calculado pela diferença entre gordura e EST. A CCS foi analisada por microscopia óptica (método de referência), citometria de fluxo em dois laboratórios da RBQL e EBE com um espectrômetro comercial, sendo testadas cinco diferentes versões de calibração. O coeficiente de correlação linear de Pearson foi estimado entre CCS por métodos de referência, citometria de fluxo (LAB 1 e LAB 2) e diferentes versões de EBE, para amostras de tanque e individual. Os laboratórios da RBQL (LAB 1 e LAB 2) apresentaram os maiores coeficientes de correlação e determinação, em relação ao método de referência para ambos os tipos de amostras. Todas as versões avaliadas para a EBE se correlacionaram positivamente e foram significativas, em relação ao método de referência, com melhores resultados para a versão EBE0 ( $P=0,0004$ ) para amostras oriundas de animais individuais.

Schumacher *et al.*, (2019) utilizaram a bioimpedância como método alternativo para avaliar a CCS, contagem bacteriana total (CBT), gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e sólidos não gordurosos (SNG). Foram estimadas correlações positivas entre a impedância da amostra e ST e SNG, com valores de 0,45 e 0,53 ( $P<0,01$ ), respectivamente. Já a CCS apresentou correlação negativa de -0,26 ( $P<0,05$ ) com a impedância da amostra. Os resultados indicaram que a bioimpedância elétrica pode contribuir para promover um avanço no diagnóstico imediato da qualidade do leite cru bovino.

## 2.5 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes abordagens diagnósticas para a detecção da mastite subclínica em rebanhos leiteiros, sob condições de campo.

## 2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concordância entre as categorias da dinâmica da mastite subclínica por citometria de fluxo com grupos de saúde do úbere e resultados de CMT, bem como a concordância destas categorias com a dinâmica da mastite subclínica avaliada por EBE;
- Avaliar os fatores de risco associados à ocorrência de resultados positivos no CMT;
- Avaliar os fatores de risco associados às categorias da dinâmica da mastite subclínica: novas infecções e infecções crônicas;
- Avaliar os fatores de risco associados à classificação nos grupos de saúde do úbere susceptível/suspeita e mastítica.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Vale do Braço do Norte, Santa Catarina, Brasil em duas propriedades: uma localizada no município de Braço do Norte (Latitude 28°13'56.9"S longitude 49°07'20.9"W) – Propriedade 1 e outra no município de Orleans (Latitude 28°19'36.2"S longitude 49°14'05.5"W) – Propriedade 2. Previamente ao início do período experimental, foi realizado um estudo piloto com duração de cinco meses com objetivo de testar as metodologias experimentais, as rotinas de coleta de dados e envio de amostras aos laboratórios, assim como realizar análises para calibração prévia do equipamento de espectroscopia de bioimpedância elétrica. O período experimental teve duração de oito meses, entre maio e dezembro de 2024, no qual foram coletadas amostras de 103 vacas em lactação, perfazendo 494 amostras.

### 3.1 DESCRIÇÃO DAS FAZENDAS

Em ambas as propriedades, o sistema de produção era baseado no uso de pastagem com suplementação que consiste em silagem de milho e concentrado comercial. A pastagem consistia em gramíneas perenes do gênero (*Cynodon* spp.), cultivares Tifton 85 e Estrela Africana durante a primavera-verão e pastagens anuais de Aveia (*Avena sativa* L.) e Azevém

(*Lolium multiflorum* Lam.) durante outono – inverno. Na propriedade 1, os animais permaneciam soltos nas áreas de pastagem com acesso a sombreamento natural. Já na propriedade 2, os animais eram mantidos em sistema de semi-confinamento, alojados em instalação do tipo *Compost barn*.

O rebanho leiteiro em ambas as propriedades era constituído por animais das raças Jersey, Holandês e mestiças Holandês × Jersey. Ambas as propriedades realizavam escrituração individual de dados zootécnicos e recebiam assistência técnica para realização de manejo reprodutivo e nutricional dos rebanhos.

O sistema de ordenha adotado nas duas propriedades era do tipo espinha de peixe, linha média e sem extração automática. As rotinas de manejo de ordenha incluíam: descarte dos três primeiros jatos de leite, desinfecção de tetos *pré-dipping*, secagem dos tetos com papel toalha, ordenha e desinfecção de tetos *pós-dipping*. O período seco adotado era de 60 dias, com aplicação de terapia de vaca seca, consistindo no uso de antimicrobianos e selante de tetos. Antes do início do experimento, o diagnóstico de mastite subclínica era realizado esporadicamente por meio do *California Mastitis Test*.

### 3.2 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

Todas as vacas em lactação dos dois rebanhos foram amostradas mensalmente, com intervalos médios de 32 dias entre as coletas. Animais que apresentaram sinais clínicos de mastite foram excluídos das amostragens. Ao término da ordenha, a produção (kg/leite) de cada vaca foi registrada utilizando medidores de leite (Milk Meter<sup>®</sup>). O leite foi homogeneizado por 30 segundos, e posteriormente coletada uma amostra de aproximadamente 60 ml da ordenha da tarde, a qual foi mantida sob refrigeração a 4 °C. Na ordenha da manhã seguinte, o mesmo procedimento foi realizado, com a coleta de aproximadamente 90 ml de leite. As duas frações foram homogeneizadas, formando uma amostra composta, a qual foi fracionada em duas alíquotas (A e B) para realização das análises laboratoriais.

A alíquota A foi transferida para um frasco de 40 ml contendo conservante bactericida bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) e encaminhadas sob refrigeração a um laboratório participante da Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (Laboratório de Qualidade do Leite – LQL/CPA/EVZ/UFG). A composição do leite (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico do leite e caseína) foi analisada através do método de infravermelho médio, através do equipamento MilkoScan<sup>™</sup> 7 RM, calibrado conforme ISO 9622/IDF 141:2013. O teor de sólidos não gordurosos foi calculado pela diferença entre gordura

e sólidos totais. As análises de CCS e CCSD, foram realizadas por citometria de fluxo, através do equipamento CombiFoss 7 DC (FOSS, Hilleroed, Dinamarca), calibrado segundo ISO 13366-2/IDF 148-2:2006, conforme a metodologia descrita por Damm *et al.*, (2017).

A alíquota B foi transferida para um frasco de 40 ml, sem adição de conservantes, e mantida sob refrigeração entre 3 e 8 °C para posterior análise, realizada em até 24 horas após a coleta. Foram determinados os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio ureico do leite, além da contagem de células somáticas, pelo método de EBE, utilizando um espectrômetro comercial (MilkSpec<sup>®</sup>) composto por sonda tetrapolar e conectado a um software específico. Os modelos de regressão utilizados pelo software do espectrômetro para estimar os constituintes do leite foram avaliados pelo fabricante do equipamento nos *softwares Unscrambler (CAMO Analytics, Japão) e Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)*, explorando-se um total de 29 frequências de 0,1 a 1000 kHz, sendo duas em baixa frequência, 22 em média frequência e 5 em alta frequência, conforme descrito por Zuffo (2021).

### 3.3 CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT)

Durante o procedimento de amostragem, foi realizado o diagnóstico de mastite subclínica por meio do CMT, imediatamente após a desinfecção dos tetos e descarte dos três primeiros jatos de leite. Para a realização do CMT, foram adicionados 2 ml de reagente (Tadabras<sup>®</sup>) e 2 ml de leite na raquete específica para o teste. Após a homogeneização da mistura, a reação em cada teto foi avaliada e classificada conforme os critérios descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre resultados do teste CMT, contagem de células somáticas (CCS) e escore de células somáticas (ECS)

Escore	Reação/viscosidade	CCS (x1000 células/mL)	ECS
0	Ausente	0 – 200	0 – 4
Traços	Leve	150 – 500	5
+	Leve/moderada	400 – 1.500	6
++	Moderada	800 – 5.000	7 – 8
+++	Intensa	> 5.000	>9

Fonte: adaptado de Constable *et al.*, (2017).

### 3.4 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO

Foram coletados dados para hiperqueratose na extremidade dos tetos, profundidade e sujidade do úbere. As avaliações foram realizadas em duas visitas, com intervalo médio de três meses, abrangendo todas as vacas em lactação no momento das coletas. Ao final do período experimental, foram obtidas 139 observações, considerando a repetição de animais nas visitas. A observação das condições da extremidade dos tetos foi realizada após a ordenha, antes da aplicação do desinfetante de tetos. A gravidade da hiperqueratose foi classificada visualmente através da pontuação em escores 1 (sem anel), 2 (anel liso ou levemente áspero), 3 (anel áspero) ou 4 (anel muito áspero) através de uma avaliação em escores, conforme indicado por Mein *et al.*, (2001). A partir do escore de hiperqueratose na extremidade dos tetos, foram obtidos escores médios da hiperqueratose dos quatro tetos de cada vaca. A avaliação da profundidade do úbere foi realizada previamente a realização da ordenha. Antes da ordenha, foi determinada a profundidade do úbere a partir da distância do piso do úbere até a articulação tibiotársica (jarrete), mensurada com o auxílio de uma fita métrica, sendo a metodologia adaptada a partir do trabalho de Valloto; Ribas Neto (2012). A determinação da sujidade do úbere foi avaliada em 4 escores, de 1 a 4, onde 1 indicava um úbere limpo, 2 úbere ligeiramente sujo, 3 úbere moderadamente sujo e 4 úbere extremamente sujo, de acordo com os critérios estabelecidos por Ruegg (2003).

Foi elaborada uma base de dados contendo as seguintes informações: identificação da propriedade, identificação dos animais, raça, ordem de parto (OP), data do último parto, DEL e produção de leite (kg/dia) obtida na data da coleta da amostra. Também foram registrados os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, caseína, NUL, CCS e CCSD e as avaliações dos fatores de risco.

### 3.5 DINÂMICA DA MASTITE SUBCLÍNICA E GRUPOS DE SAÚDE DO ÚBERE

As vacas foram consideradas positivas para mastite subclínica quando apresentaram CCS acima de 200.000 células/mL, (IDF 2013). A dinâmica da mastite subclínica para cada vaca foi avaliada por meio de uma comparação entre dois meses consecutivos, avaliando a CCS no mês anterior (MA) em relação ao mês em curso (MC). Essa classificação foi feita da seguinte forma:  $MA \leq 200.000$  e  $MC \leq 200.000$  (sadia);  $MA \leq 200.000$  e  $MC > 200.000$  (nova infecção);  $MA > 200.000$  e  $MC > 200.000$  (infecção crônica); e  $MA > 200.000$  e  $MC \leq 200.000$  (cura)

(Schukken; Kremer, 1996). Esta metodologia foi aplicada tanto para a CCS avaliada por citometria de fluxo, quanto por espectroscopia de bioimpedância elétrica.

Os animais também foram classificados para grupos de saúde do úbere conforme ponto de corte para CCSD de acordo com modelos definidos por Bobbo *et al.*, (2020) e Schwarz *et al.*, (2020b) descritos na Tabela 2. O objetivo da aplicação dos dois modelos foi avaliar a aplicabilidade na caracterização do status inflamatório da glândula mamária. Para fins descritivos, a variável contagem celular de polimorfonucleares e linfócitos (CCPL), que representa o número de PMN + linfócitos/mL foi calculada pela multiplicação de CCS × CCSD, conforme descrito por Zecconi *et al.*, (2023).

Tabela 2 - Grupos de saúde do úbere conforme pontos de corte definidos por Bobbo *et al.*, (2020) e Schwarz *et al.*, (2020b)

GSU	CCS (x1000 células/mL)	CCSD (%)	DEL	Referência	
Sadia	≤ 200	≤66,3 ≤69,2 ≤69,3	≤100 101 – 200 >200	Bobbo <i>et al.</i> , (2020)	
Susceptível	≤ 200	>66,3 >69,2 >69,3	≤100 101 – 200 >200		
Mastítica	>200	>66,3 >69,2 >69,3	≤100 101 – 200 >200		
Crônica	>200	≤66,3 ≤69,2 ≤69,3	≤100 101 – 200 >200		
Sadia	≤ 200	≤65	--		Schwarz <i>et al.</i> , (2020)
Suspeita	≤ 200	>65	--		
Mastítica	>200	>65	--		
Crônica/persistente	>200	≤65	--		

GSU: Grupos de saúde do úbere. CCS: contagem de células somáticas. CCSD: contagem diferencial de células somáticas. DEL: dias em lactação.

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância entre as diferentes abordagens para o diagnóstico de mastite subclínica foi analisada por meio do coeficiente Kappa ponderado e pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o procedimento FREQ do pacote estatístico SAS<sup>®</sup>. O coeficiente Kappa ponderado, foi utilizado para estimar a concordância entre as relações da DMSC estimada por CF com os GSU, de acordo com os modelos propostos por Bobbo *et al.*, (2020) e por Schwarz *et al.*, (2020b). Também foram avaliadas as relações da DMSC estimada por CF com a DMSC estimada por EBE, bem como dos GSU de acordo com a metodologia descrita por Bobbo *et al.*,

(2020) e por Schwarz *et al.*, (2020b) entre si. Para a determinação dos GSU foram considerados os dados com CCS entre 50.000 a 1.500.000 cél./mL, intervalo correspondente à faixa de desempenho do método FOSS CCSD (Damm *et al.*, 2017).

O coeficiente Kappa de Cohen ( $\kappa$ ) varia entre -1 e +1, em que valores próximos de 0 indicam concordância equivalente ao acaso e  $\kappa = 1$  representa concordância perfeita (Cohen, 1960). A interpretação das medidas de concordância foi realizada conforme McHugh (2012), sendo classificada como: ausência de concordância ( $\kappa = 0-0,20$ ), mínima ( $\kappa = 0,21-0,39$ ), fraca ( $\kappa = 0,40-0,59$ ), moderada ( $\kappa = 0,60-0,79$ ), forte ( $\kappa = 0,80-0,90$ ) e quase perfeita ( $\kappa > 0,90$ ).

Por meio do teste de Qui-quadrado, foram avaliadas as relações do status de CMT com a DMSC estimada por CF, assim como pelos grupos de saúde propostos por Bobbo *et al.*, (2020) e por Schwarz *et al.*, (2020b). Para a análise do CMT, foram consideradas positivas as vacas que apresentaram, no mínimo, uma cruz em um ou mais quartos mamários, sendo as demais classificadas como negativas.

Visando verificar a adequação das diferentes estratégias de diagnóstico de mastite subclínica com variáveis relacionadas à prevalência da mastite, também foram avaliados fatores de risco para uma vaca apresentar uma nova infecção intramamária ou infecção crônica de acordo com a dinâmica da mastite estimada por citometria de fluxo, dos grupos de saúde do úbere mastítica e susceptível conforme metodologia descrita por Bobbo *et al.*, (2020) e por Schwarz *et al.*, (2020b), assim como o risco de uma vaca apresentar diagnóstico positivo para CMT. Para esta análise foi realizada uma regressão logística utilizando o procedimento GLMMIX do pacote estatístico SAS<sup>®</sup>. Para cada abordagem de diagnóstico da mastite subclínica foi realizada uma análise inicial com todo o conjunto de dados disponíveis para as variáveis dias em lactação, agrupados em até 100 dias, de 101 a 200, de 201 a 300 e maior que 300 dias, e da ordem de parto agrupada com sendo 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> ou mais lactações. Em um subconjunto menor de informações foram avaliadas, além destas variáveis as variáveis relacionadas aos tetos e úbere, as quais foram analisadas na forma de variáveis binárias, sendo hiperqueratose positiva quando pelo menos um dos tetos apresentava escore de ponta de teto maior ou igual a 3 e negativas as demais. A profundidade de úbere, considerados rasos quando o piso do úbere estava acima da linha do jarrete e profundos quando abaixo desta linha. Sujidade do úbere, sendo considerado sujo quando tinha escore maior ou igual a 1 e negativo quando zero. As variáveis de úbere e tetos não foram incluídas nos modelos para as análises de risco de grupos de saúde do úbere, devido ao reduzido número de observações. Para o risco de uma vaca apresentar diagnóstico positivo para CMT, adicionalmente foi avaliado um modelo incluindo além das variáveis DEL e ordem de parto, o escore de células somáticas (ECS) estimado por

citometria de fluxo ou por EBE, visando avaliar a concordância destes com o diagnóstico por CMT. Os dados de CCS foram transformados para ECS pela equação  $ECS = \log_2(CCS/100) + 3$  (Shook, 1982). Para os grupos de saúde não foi realizada análise do risco de uma vaca ter mastite crônica/persistente, devido ao pequeno número de observações. Foram consideradas significativas as variáveis com  $P < 0,05$  e tendência para  $P < 0,10$ , sendo seus *odds ratio* considerados significativos quando o intervalo de confiança com 95% de probabilidade não incluía o valor 1,0.

#### 4 RESULTADOS

Ao nosso saber, esta é a primeira pesquisa envolvendo grupos de saúde baseados em CCS diferencial no Brasil. Ao final do período experimental foram obtidas 494 observações referentes a 103 vacas, distribuídas entre as duas propriedades sendo 43,52% (215/494) provenientes da propriedade 1 e 56,48% (279/494) da propriedade 2. Quanto à composição racial, 62,88% das análises foram de vacas da raça Jersey, 33,47% da raça Holandesa e 3,65% de animais cruzados entre Holandesa e Jersey.

Os valores médios de produção de leite, composição química dos principais constituintes determinados por espectroscopia no infravermelho, CCS e CCSD por CF, assim como a composição química e a CCS obtidas por EBE, permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela IN 76 (Brasil, 2018). Os valores médios de CCS estimados por CF e por EBE foram de 307.940 e 373.850 células/ml, respectivamente. A CCSD apresentou média de 70,06%, variando de 25,10% a 90,60%, da CCS (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatística descritiva das variáveis analisadas das amostras individuais de leite por infravermelho médio (IV), citometria de fluxo (CF) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE)

Variável	N <sup>1</sup>	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Leite, kg/vaca/dia	484	23,55	6,77	10	43,5
Gordura IV, %	490	4,17	0,79	2,39	6,49
Proteína IV, %	493	3,51	0,42	2,63	5,02
Lactose IV, %	493	4,48	0,24	3,40	5,29
EST <sup>2</sup> IV, %	491	13,12	1,11	10,38	16,85
ESD <sup>3</sup> IV, %	491	8,95	0,45	7,72	10,79
CCS <sup>4</sup> (x 1000) CF	494	307,94	532,54	5	4059
ECS <sup>5</sup> CF	494	3,29	1,95	-1,32	8,34
CCSD <sup>6</sup> , %	287	70,06	13,39	25,10	90,60
Gordura EBE, %	416	3,98	0,33	3,28	6,28
Proteína EBE, %	419	3,42	0,13	2,69	4,91
Lactose EBE, %	419	4,63	0,12	3,87	4,94
EST <sup>2</sup> EBE, %	417	12,88	0,41	11,74	14,54
ESD <sup>3</sup> EBE, %	418	8,90	0,47	6,38	10,38
CCS <sup>4</sup> (x 1000) EBE	420	373,85	380,11	47	6886
ECS <sup>5</sup> EBE	420	4,42	1,20	1,91	9,10

<sup>1</sup>N: Número de observações <sup>2</sup>EST: Extrato seco total. <sup>3</sup>ESD: Extrato seco desengordurado. <sup>4</sup>CCS: contagem de células somáticas. <sup>5</sup>ECS: escore de células somáticas,  $ECS = \log_2((CCS+1)/100)+3$ . <sup>6</sup>CCSD: contagem de células somáticas diferencial.

Fonte: elaborada pelos autores (2025)

Após a exclusão de registros sem informações suficientes para classificação nas categorias da DMSC, permaneceram 416 amostras com dados válidos para esta classificação. A prevalência média geral da mastite subclínica (maior que 200.000 células/ml estimadas por citometria de fluxo), incluindo todos os testes realizados durante o período do estudo foi de 35,26%.

#### 4.1 RELAÇÃO ENTRE A DINÂMICA DA MASTITE SUBCLÍNICA E GRUPOS DE SAÚDE DO ÚBERE

Considerando o conjunto completo de dados (n = 416), a prevalência média das categorias da DMSC, estimadas por CF, foi de 11,8% de novas infecções, 23,42% de infecções crônicas, além de 56,97% de sadias e 7,45% de curadas. Para os GSU, a classificação foi gerada a partir de dados dentro da faixa de desempenho do método FOSS CCSD, com CCS entre 50.000 a 1.500.000 células/mL (Damm *et al.*, 2017), considerando os animais com dados disponíveis para ambos os modelos (n = 287). A prevalência observada segundo os critérios de Bobbo *et al.*, (2020) foi de 28,57% de vacas sadias, 20,56% suscetíveis, 42,16% mastíticas e 8,71% crônicas. Já segundo o modelo proposto por Schwarz *et al.*, (2020b), as prevalências foram de 22,65% de vacas sadias, 26,48% suspeitas, 45,64% mastíticas e 5,25% crônicas.

As categorias da DMSC foram relacionadas com os GSU avaliadas pelos dois modelos e entre os dois modelos entre si.

#### 4.1.1 Relação entre a dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere conforme Bobbo *et al.*, (2020).

A relação entre as categorias da DMSC, sendo vacas sadias, com novas infecções, com infecções crônicas ou curadas, conforme Schukken; Kremer (1996) foi avaliada em comparação aos grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO) definidos como vacas sadias, susceptíveis, mastíticas e crônicas conforme critérios descritos por Bobbo *et al.*, (2020). A medida de concordância indicou que os modelos apresentaram concordância significativamente superior à esperada ao acaso. No entanto, o coeficiente o Kappa ponderado revelou concordância fraca ( $\kappa = 0,59$ ; IC 95%: 0,5333–0,6481) (Tabela 4).

Dentre os 106 casos classificados como vacas sadias pela DMSC, 60,38% apresentaram concordância com a classificação pelo modelo GSU\_BOBBO e 39,62% das observações foram classificadas como suscetíveis, mostrando que as duas metodologias abordam de modo diverso o diagnóstico de animais com MSC. Porém, no grupo das vacas classificadas como curadas pela DMSC, um percentual maior (53,85%) das vacas foi classificado como susceptíveis pelo modelo GSU\_BOBBO e em menor proporção como sadias (Tabela 4), podendo indicar que o perfil celular de vacas sadias e aquelas que tinham CCS maior que 200.000 (cél./mL) no mês anterior não é o mesmo, tanto em termos de CCS, como de CCSD e conseqüentemente da CCPL.

As novas infecções pela DMSC foram predominantemente (80,85%) classificadas como mastíticas pelo modelo GSU\_BOBBO (Tabela 4), demonstrando que ambos os modelos apresentam bastante similaridade, mesmo que a DMSC analisa o comportamento da CCS durante o período avaliado, enquanto os grupos de saúde consideram somente a CCS e a CCSD no tempo presente.

Apenas 16,67% dos casos crônicos classificados pela DMSC mantiveram a mesma classificação pelo GSU\_BOBBO, enquanto um percentual maior (83,33%) foi enquadrado no grupo de vacas mastíticas (Tabela 4) indicando que os modelos adotam critérios distintos para caracterizar os estágios da infecção intramamária.

Tabela 4 - Relação entre a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) e grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO) conforme Bobbo *et al.*, (2020)

DMSC		GSU_BOBBO				
		Sadia	Susceptível	Mastítica	Crônica	Total
Sadia	N <sup>1</sup> (%)	64 (60,38)	42 (39,62)	0 (0)	0 (0)	106 (38,55)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	97	116	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	55,33	76,10	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	54,70	89,13	-	-	
Curada	N <sup>1</sup> (%)	12 (46,15)	14 (53,85)	0 (0)	0 (0)	26 (9,45)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	116	145	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	60,11	77,38	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	71,45	112,05	-	-	
Nova	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	38 (80,85)	9 (19,15)	47 (17,09)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	667	258	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	79,49	54,83	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	545,89	143,31	
Crônica	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	80 (83,33)	16 (16,67)	96 (34,91)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	863,96	367	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	79,16	59,41	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	699,28	225,40	
Total		76 (27,64)	56 (20,36)	118 (42,91)	25 (9,09)	275 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial. <sup>4</sup>CCPL (células/mL): média da contagem celular de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos.

Fonte: elaborada pelos autores (2025)

#### 4.1.2 Relação entre Dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere conforme Schwarz *et al.*, (2020b)

A relação entre as categorias da DMSC conforme Schukken; Kremer (1996), foi avaliada em comparação aos GSU conforme Schwarz *et al.*, (2020b) classificados como sadia, suspeita, mastítica ou crônica/persistente. Observou-se associação significativa entre a DMSC e os GSU, de acordo com o modelo GSU\_SCHWARZ ( $\chi^2 = 280,87$ ;  $p < 0,0001$ ). O coeficiente Kappa ponderado ( $\kappa = 0,60$ ; IC 95%: 0,5469 – 0,6598) revelou uma concordância moderada, sugerindo que, embora não haja coincidência completa, os modelos apresentam similaridade nas categorias avaliadas.

Verificou-se que 49,06% das vacas classificadas como sadias e 30,77% das curadas, conforme a DMSC, foram classificadas sadias pelo modelo GSU\_SCHWARZ. No entanto, nesse mesmo modelo, a maioria dessas vacas foi considerada suspeita, incluindo 50,94% das sadias e 69,23% das curadas (Tabela 5). Esses resultados indicam que os critérios utilizados para o diagnóstico de mastite subclínica diferem entre os métodos. Além disso, sugerem que o perfil das células de defesa presentes no leite pode variar mesmo entre vacas com CCS inferior a 200.000 células/mL por dois meses consecutivos, ou naquelas que apresentaram CCS elevada no mês anterior, refletindo diferentes estágios ou intensidades da resposta inflamatória.

Dos casos de novas infecções intramamárias identificados pela DMSC, 89,36% foram também classificados como mastíticas pelo modelo GSU\_SCHWARZ (Tabela 5). Essa porcentagem indica uma alta concordância entre os métodos. Enquanto o modelo GSU\_SCHWARZ realiza a classificação com base na CCS e CCSD medidas no momento da coleta, a dinâmica da MSC avalia a evolução da CCS ao longo do período analisado, refletindo diferentes abordagens para a detecção da mastite subclínica.

Apenas 10,42% dos casos de mastite crônica pela DMSC, foram também classificadas como infecções crônicas/persistentes pelo GSU\_SCHWARZ, enquanto a maioria (89,58%) foram enquadradas no grupo de vacas mastíticas (Tabela 5). Ainda que a dinâmica adote o critério de avaliação ao longo do período avaliado, o GSU\_SCHWARZ indica um comportamento diverso das células de defesa presentes na glândula mamária, evidenciado pela CCSD abaixo do ponto de corte neste grupo.

Tabela 5 - Relação entre a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) e grupos de saúde do úbere (GSU\_SCHWARZ), conforme Schwarz *et al.*, (2020b)

DMSC		GSU_SCHWARZ				
		Sadia	Suspeita	Mastítica	Crônica	Total
Sadia	N <sup>1</sup> (%)	52 (49,06)	54 (50,94)	0 (0)	0 (0)	106 (38,55)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	97	112	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	52,63	74,07	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	52,01	84,07	-	-	
Curada	N <sup>1</sup> (%)	8 (30,77)	18 (69,23)	0 (0)	0 (0)	26 (9,45)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	100	145	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	55,97	75,38	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	56,71	109,78	-	-	
Nova	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	42 (89,36)	5 (10,64)	47 (17,09)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	628	254	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	78,24	45,54	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	510,57	117,90	
Crônica	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	86 (89,58)	10 (10,42)	96 (34,91)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	837	300,80	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	78,34	54,58	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	673,05	166,67	
Total		60 (21,82)	72 (26,18)	128 (46,55)	15 (5,45)	275 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial. <sup>4</sup>CCPL (células/mL): média da contagem celular de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos.

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

#### 4.1.3 Relação entre grupos de saúde do úbere conforme Bobbo *et al.*, (2020) e Schwarz *et al.*, (2020b)

Foi avaliada a relação entre os GSU, categorizados conforme modelos descritos por Bobbo *et al.*, (2020) e Schwarz *et al.*, (2020b). Observou-se associação significativa entre os grupos de saúde do úbere conforme modelos descritos ( $\chi^2 = 622,66$ ;  $p < 0,0001$ ). O coeficiente Kappa ponderado evidenciou concordância quase perfeita entre os dois modelos para a classificação dos GSU ( $\kappa = 0,94$ ; IC 95%: 0,9238 – 0,9639) (Tabela 6).

Foi identificada elevada similaridade entre os modelos GSU\_BOBBO e GSU\_SCHWARZ na categorização do estado de saúde do úbere, evidenciada pelos valores de CCS, CCSD e, conseqüentemente, de CCPL. Houve concordância em 100% dos casos

diagnosticados como susceptíveis (GSU\_BOBO) e suspeitos (GSU\_SCHWARZ), bem como nos casos diagnosticados como mastíticos por ambos os modelos. A concordância foi de 79,29% para vacas classificadas como sadias e de 60% para aquelas consideradas crônicas. As divergências observadas entre os grupos de vacas sadias e mastíticas refletem os diferentes critérios de classificação adotados por cada modelo (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO) conforme Bobbo *et al.*, (2020) e grupos de saúde do úbere (GSU\_SCHWARZ) conforme Schwarz *et al.*, (2020b)

GSU_BOBBO		GSU_SCHWARZ				
		Sadia	Suspeita	Mastítica	Crônica	Total
Sadia	N <sup>1</sup> (%)	65 (79,27)	17 (20,73)	0 (0)	0 (0)	82 (28,57)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	99,95	115,58	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	52,75	67,28	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	53,29	78,07	-	-	
Susceptível	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	59 (100)	0 (0)	0 (0)	59 (20,56)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	124,18	-	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	76,23	-	-	
	CCPL <sup>4</sup>	-	95,03	-	-	
Mastítica	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	121 (100)	(0)	121 (42,16)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	795,04	-	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	79,24	-	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	644,79	-	
Crônica	N <sup>1</sup> (%)	0 (0)	0 (0)	10 (40)	15 (60)	25 (8,71)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	-	-	392,8	285	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	-	-	67,06	51,56	
	CCPL <sup>4</sup>	-	-	264,01	150,41	
Total		65 (22,65)	76 (26,48)	131 (45,64)	15 (5,23)	287 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial. <sup>4</sup>CCPL (células/mL): média da contagem celular de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos.

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

#### 4.1.4 Relação entre a dinâmica da mastite subclínica por citometria de fluxo e por espectroscopia de bioimpedância elétrica

Para a análise da relação entre as classificações das categorias da DMSC avaliadas por CF e por EBE foram excluídos os dados referentes ao primeiro mês de coleta, devido à ausência

de informações necessárias para a determinação da dinâmica. Com isso, foram analisadas 347 observações que continham, simultaneamente, a categorização da dinâmica da mastite por ambos os métodos. O objetivo desta análise foi avaliar a concordância entre as classificações fornecidas por CF e EBE. O coeficiente Kappa ponderado indicou nenhuma concordância entre os dois modelos ( $\kappa = 0,20$ ; IC 95%: 0,1048 – 0,3018) (Tabela 7).

Entre os 194 casos identificados como vacas sadias pela DMSC avaliada por CF, apenas 30,93% mantiveram essa condição na avaliação por EBE. As demais observações (69,19%) foram distribuídas entre as categorias de curadas, novas infecções e infecções crônicas, indicando que os métodos avaliam de modo diverso a CCS. No grupo de vacas classificadas como curadas pela dinâmica avaliada por CF, a correspondência com a EBE foi observada em 39,28% dos 28 casos, enquanto que os demais foram classificados entre as demais categorias. O comportamento foi semelhante no grupo de novos casos de mastite subclínica pela CF, em que 42,86% tiveram a mesma classificação por EBE. Dos casos de mastite crônica pela CF, 37,34% tiveram a mesma classificação pela EBE, enquanto os demais foram classificados nas demais categorias (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre as categorias da dinâmica da mastite subclínica (DMSC) estimada por citometria de fluxo (CF) e por espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE)

DMSC CF		DMSC EBE				
		Sadia	Curada	Nova	Crônica	Total
Sadia	N <sup>1</sup> (%)	60 (30,93)	24 (12,37)	75 (38,66)	35 (18,04)	194 (55,90)
Curada	N <sup>1</sup> (%)	5 (17,85)	11 (39,28)	6 (21,42)	6 (21,42)	28 (8,06)
Nova	N <sup>1</sup> (%)	8 (19,04)	5 (11,90)	18 (42,86)	11 (26,19)	42 (12,10)
Crônica	N <sup>1</sup> (%)	13 (15,66)	11 (13,25)	28 (33,73)	31 (37,34)	83 (23,91)
Total		86 (24,78)	51 (14,69)	127 (36,59)	83 (23,91)	347 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências.

Fonte: elaborada pelos autores (2025)

#### 4.1.5 Relação entre CMT, dinâmica da mastite subclínica e grupos de saúde do úbere

A relação entre CMT, DMSC e GSU foram analisadas com uma subamostra na qual foram excluídos, além dos dados do primeiro mês de coleta pela ausência de informações da dinâmica da mastite subclínica, aqueles com valores de CCS fora da faixa de detecção do

equipamento de CCSD (entre 50.000 e 1.500.000 células/mL), assim como de vacas sem avaliação pelo CMT.

A relação entre os resultados de CMT negativo, indicado pela ausência de reação/viscosidade, ou positivo quando pelo menos um quarto mamário apresentou reação leve a moderada (uma cruz), conforme Constable *et al.*, (2017) foi avaliada em comparação as categorias da DMSC, conforme Schukken; Kremer (1996). Os percentuais de CCSD apresentados tem a finalidade de melhorar a descrição dos resultados. A distribuição das frequências entre o CMT e a DMSC por CF é apresentada na (Tabela 8). O teste de Qui-quadrado indicou associação significativa entre as variáveis ( $\chi^2 = 102,02$ ;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 8).

Das vacas com CMT negativo, 81,5% foram classificadas pela DMSC como vacas sadias ou curadas. No entanto, a dinâmica também indicou a presença de mastite em 18,48% das observações, correspondendo aos casos de novas infecções e infecções crônicas. Em relação aos resultados positivos ao CMT, 69,56% foram classificadas pela DMSC como novas infecções ou infecções crônicas. A CCSD destes grupos também apresentou percentuais elevados, confirmando uma resposta inflamatória ativa. No entanto, em 30,43% dos casos com resultado positivo ao CMT, não houve confirmação de mastite pela DMSC, sendo essas observações classificadas como vacas sadias ou curadas.

Tabela 8 - Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e a dinâmica da mastite subclínica (DMSC) por citometria de fluxo (CF)

CMT		DMSC				
		Sadia	Nova	Crônica	Curada	Total
Negativa	N <sup>1</sup> (%)	160 (75,83)	18 (8,53)	21 (9,95)	12 (5,69)	211 (64,72)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	63	353	591	108	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	63,00	68,71	72,95	64,26	
Positiva	N <sup>1</sup> (%)	23 (20,00)	20 (17,39)	60 (52,17)	12 (10,43)	115 (35,28)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	102	717	821	140	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	66,19	77,29	77,67	73,56	
Total		183 (56,13)	38 (11,66)	81 (24,85)	24 (7,36)	326 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial.

Fonte: elaborada pelos autores (2025)

#### 4.1.6 Relação entre CMT e grupo de saúde do úbere, conforme Bobbo *et al.*, (2020)

A relação entre os resultados de CMT negativo, indicados pela ausência de reação/viscosidade, ou positivo quando pelo menos um quarto mamário apresentou reação leve a moderada (uma cruz), conforme Constable *et al.*, (2017) foi avaliada em comparação aos grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO) definidos conforme critérios descritos por Bobbo *et al.*, (2020). A distribuição das frequências entre o CMT e GSU\_BOBBO, é apresentada na Tabela 9. O teste de Qui-quadrado indicou associação significativa entre as variáveis ( $\chi^2 = 40,4048$ ;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 9).

Dentre as observações com resultado negativo ao CMT, 41,53% foram classificadas como sadias pelo modelo GSU\_BOBBO. No entanto, a classificação de amostras como susceptíveis, mastíticas e crônicas pelo GSU\_BOBBO evidencia que os métodos adotam critérios distintos para o diagnóstico da mastite subclínica, o que pode ser evidenciado pelas médias elevadas de CCS nos grupos de vacas mastíticas e crônicas, (acima de 200.000 células/mL), bem como pelo percentual elevado da CCSD no grupo de vacas mastíticas (Tabela 9).

Das observações com resultado positivo ao CMT, 87,27% apresentaram indicativos de inflamação, segundo critérios do modelo GSU\_BOBBO, para vacas susceptíveis, mastíticas e crônicas. A maior concordância foi observada com o grupo de vacas mastíticas, o qual apresentou os valores mais elevados de CCS, CCSD e CCPL, caracterizando uma resposta inflamatória ativa. Apenas 14,73% das amostras positivas ao CMT foram classificadas como sadias pelo GSU\_BOBBO, com valores de CCS e CCSD abaixo dos limiares estabelecidos (Tabela 9).

Tabela 9 - Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO) conforme Bobbo *et al.*, (2020)

CMT		GSU_BOBBO				
		Sadia	Susceptível	Mastítica	Crônica	Total
Negativa	N <sup>1</sup> (%)	49 (41,53)	31 (26,27)	27 (22,88)	11 (9,32)	118 (51,75)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	99	117	574	257	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	54,68	76,56	77,10	55,90	
	CCPL <sup>4</sup>	54,99	90,06	443,67	145	
Positiva	N <sup>1</sup> (%)	14 (14,73)	18 (16,36)	68 (61,82)	10 (9,09)	110 (48,25)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	110	127	863	410	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	59,54	76,27	79,98	61,25	
	CCPL <sup>4</sup>	66,54	97,79	706,79	258,88	
Total		63 (27,63)	49 (21,49)	95 (41,67)	21 (9,21)	228 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial. <sup>4</sup>CCPL (células/mL): média da contagem celular de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos.

Fonte: elaborada pelos autores (2025)

#### 4.1.7 Relação entre CMT e grupo de saúde do úbere, conforme Schwarz *et al.*, (2020b)

A relação entre os resultados de CMT negativo, indicado pela ausência de reação/viscosidade, ou positivo quando pelo menos um quarto mamário apresentou reação leve a moderada (uma cruz), conforme Constable *et al.*, (2017) foi avaliada em comparação aos grupos de saúde do úbere (GSU\_SCHWARZ), conforme critérios descritos por Schwarz *et al.*, (2020b).

A distribuição das frequências entre o CMT e GSU\_SCHWARZ é apresentada na Tabela 10. O teste de Qui-quadrado indicou associação significativa entre as variáveis ( $\chi^2 = 40,7805$ ;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 10).

Entre as 118 observações com resultado negativo ao CMT, apenas 32,20% foram classificadas como sadias pelo modelo GSU\_SCHWARZ. No entanto, 35,59% dos casos negativos, ainda que com CCS inferior a 200.000 células/mL, o modelo identificou aumento no percentual de neutrófilos e linfócitos acima dos pontos de corte estabelecidos, classificando esses animais como suspeitos. As demais (32,2%) observações foram classificadas como mastíticas ou crônicas. Esses resultados indicam que o modelo GSU\_SCHWARZ identificou resposta inflamatória, mesmo na ausência de detecção pelo CMT (Tabela 10).

Das observações com resultado positivo ao CMT, 90,91% apresentaram indícios de reação inflamatória quando avaliadas pelo modelo GSU\_SCHWARZ, sendo classificadas como suscetíveis, mastíticas ou como crônicas. Apenas 9,09% das amostras positivas no CMT foram classificadas como sadias pelo GSU\_SCHWARZ, com CCS e CCSD abaixo dos pontos de corte (Tabela 10). Com base nos valores de CCS, CCSD e, conseqüentemente, CCPL, observa-se que o CMT apresenta limitações, ao classificar como negativas diversas vacas com indícios de mastite subclínica. Por outro lado, os resultados positivos detectados pelo teste mostraram boa concordância com os parâmetros celulares analisados, indicando que o CMT pode apresentar sensibilidade moderada na identificação de processos inflamatórios intramamários.

Tabela 10 - Relação entre o California Mastitis Test (CMT) e grupos de saúde do úbere (GSU\_SCHWARZ) conforme Schwarz *et al.*, (2020b)

CMT		GSU_SCHWARZ				Total
		Sadia	Suspeita	Mastítica	Crônica	
Negativa	N <sup>1</sup> (%)	38 (32,20)	42 (35,59)	31 (26,27)	7 (5,93)	118 (51,75)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	99	117	574	257	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	54,68	76,56	77,10	55,90	
	CCPL <sup>4</sup>	49,88	85,50	411,63	128,36	
Positiva	N <sup>1</sup> (%)	10 (9,09)	22 (20)	74 (67,27)	4 (3,64)	110 (48,25)
	CCS <sup>2</sup> (x1000)	110	127	863	410	
	CCSD <sup>3</sup> (%)	59,54	76,27	79,98	61,25	
	CCPL <sup>4</sup>	60,21	94,97	675,69	162,24	
Total		48 (21,05)	64 (28,07)	105 (46,05)	11 (4,82)	228 (100)

<sup>1</sup>N (%): Frequência absoluta (frequência relativa) das ocorrências. <sup>2</sup>CCS (x1000 células/mL): média da contagem de células somáticas. <sup>3</sup>CCSD (%): média da contagem de células somáticas diferencial. <sup>4</sup>CCPL (células/mL): média da contagem celular de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos.

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

## 5 FATORES DE RISCO PARA AS METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA

### 5.1 Fatores de risco para novas infecções intramamárias

A partir da DMSC foi avaliado o risco de uma vaca apresentar um novo caso de mastite. Foram analisados dois modelos de regressão logística: um incluindo as variáveis binárias hiperqueratose, profundidade e sujidade de úbere (FR\_NOVA\_UT), e outro sem essas variáveis

(FR\_NOVA), uma vez que esses dados foram coletados apenas em alguns meses, o que reduziu o número de observações. Para a interpretação das estimativas ao risco relacionadas às variáveis DEL e OP, consideramos o modelo com o conjunto total de dados.

No modelo FR\_NOVA, composto pelo conjunto total de dados, apenas DEL apresentou uma tendência para novas infecções ( $P = 0,0653$ ) (Tabela 11), indicando que vacas acima de 300 DEL, apresentaram risco maior para novas infecções subclínicas ( $OR=2,56$ ) em comparação às de início de lactação (Tabela 11). Porém, a OP não aumentou o risco para novas infecções intramamárias (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de P e estimativas dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para novas infecções intramamárias de acordo com os modelos de regressão logística aplicados

Variável	FR_NOVA_UT p-valor	FR_NOVA p-valor	Categoria	FR_NOVA_UT OR (IC 95%)	FR_NOVA OR (IC 95%)
DEL <sup>1</sup>	<b>0,0529</b>	<b>0,0653</b>	≤100 <sup>6</sup>	-	1,34 (0,569 a 3,172)
			100 a 200	-	0,74 (0,265 a 2,086)
			200 a 300	-	2,56 (1,027 a 6,415)
OP <sup>2</sup>	<b>0,0470</b>	<b>0,1775</b>	-	-	-
HQ <sup>3</sup>	0,7462	-	-	-	-
PU <sup>4</sup>	0,5130	-	-	-	-
SU <sup>5</sup>	0,3616	-	-	-	-
Estação	0,1864	0,6772	-	-	-
N	139	414			

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação; <sup>2</sup>OP: ordem de parto; <sup>3</sup>HQ: hiperqueratose; <sup>4</sup>PU: profundidade de úbere; <sup>5</sup>SU: sujidade de úbere; <sup>6</sup>Categoria de referência; FR\_NOVA\_UT: Fatores de risco para novas infecções intramamárias com avaliações de teto e úbere; FR\_NOVA: Fatores de risco para novas infecções intramamárias sem observações de teto e úbere; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança; N: número de observações

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

## 5.2 Fatores de Risco para Infecções Crônicas

A partir da dinâmica da mastite subclínica, foram avaliados os fatores de risco para uma vaca desenvolver infecção crônica. Foram analisados dois modelos de regressão logística: um incluindo as variáveis binárias hiperqueratose, profundidade e sujidade de úbere FR\_CR\_UT, e outro sem essas variáveis FR\_CR.

Os valores de P das variáveis associadas ao risco de infecções crônicas indicam que no modelo FR\_CR\_UT, apenas profundidade de úbere apresentou uma tendência para infecções crônicas ( $P = 0,0615$ ) (Tabela 12).

No modelo FR\_CR, DEL e OP foram associados ao risco de infecções crônicas (Tabela 12). Vacas entre 100 a 200 DEL apresentaram maior risco ( $OR=4,58$ ) de desenvolver infecções intramamárias crônicas em comparação ao grupo de referência ( $\leq 100$  DEL). O risco aumentou progressivamente para vacas entre 200 e 300 DEL ( $OR = 7,74$ ) e foi ainda mais elevado para aquelas com mais de 300 DEL ( $OR = 15,33$ ) em relação ao grupo de referência. Vacas na segunda lactação apresentaram risco maior ( $OR= 3,27$ ) de desenvolver infecções crônicas em relação às primíparas, enquanto que as para vacas com três lactações ou mais, apresentaram ( $OR=3,67$ ) (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de P e estimativa dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para infecções crônicas de acordo com os modelos de regressão logística aplicados

Variável	FR_CR_UT p-valor	FR_CR p-valor	Categoria	FR_CR_UT OR (IC 95%)	FR_CR OR (IC 95%)
DEL <sup>1</sup>	<b>0,0963</b>	< <b>0,001</b>	$\leq 100^6$	-	-
			100 a 200	-	4,58 (1,895 a 11,085)
			200 a 300	-	7,74 (3,112 a 19,269)
OP <sup>2</sup>	<b>0,0828</b>	<b>0,0003</b>	$>300$	-	15,33 (6,005 a 39,181)
			1 <sup>6</sup>	-	-
			2	-	3,27 (1,606 a 6,684)
HQ <sup>3</sup>	0,8169	-	$\geq 3$	-	3,67 (1,927 a 7,062)
			-	-	-
PU <sup>4</sup>	<b>0,0615</b>	-	Alto <sup>6</sup>	-	-
SU <sup>5</sup>	0,2485	-	Baixo	2,81 (0,951 a 8,321)	-
Estação	0,0793	0,2647	-	-	-
N	139	414			

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação; <sup>2</sup>OP: ordem de parto; <sup>3</sup>HQ: hiperqueratose; <sup>4</sup>PU: profundidade de úbere; <sup>5</sup>SU: sujidade de úbere; <sup>6</sup>Categoria de referência; FR\_CR\_UT: Fatores de risco para infecções crônicas com avaliações de teto e úbere; FR\_CR: Fatores de risco para infecções crônicas sem observações de teto e úbere; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança; N: número de observações

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

### 5.3 Fatores de Risco para grupos de saúde do úbere susceptível e mastítica conforme Bobbo *et al.*, (2020)

Foram avaliados os fatores de risco para a classificação de vacas nos GSU susceptível (FR\_Suscept) e mastítica (FR\_Mast), conforme o modelo proposto por Bobbo *et al.*, (2020). Para o grupo susceptível (FR\_Suscept), as variáveis DEL, OP e Estação apresentaram

associação significativa (Tabela 13). Para a variável DEL, verificou-se que a partir de 200 dias após o parto as vacas apresentaram redução no risco de serem classificadas como susceptíveis (FR\_Suscept) pelo modelo GSU\_BOBBO. Tomando-se como referência os animais com até 100 DEL, vacas entre 200 e 300 DEL apresentaram risco menor (OR=0,37) de serem classificadas como susceptíveis, enquanto para vacas com mais de 300 DEL a redução ao risco foi ainda mais acentuada (OR= 0,14) (Tabela 13).

O risco para as vacas serem classificadas como susceptíveis (FR\_Suscept) também foi reduzido com o aumento da OP. Vacas na segunda lactação apresentaram risco menor (OR=0,34) quando comparadas às primíparas, enquanto vacas a partir da terceira OP este risco foi (OR=0,44) (Tabela 13). A estação do ano também se mostrou um fator associado ao grupo susceptível, sendo observado risco menor no verão (OR=0,46) em relação ao inverno (Tabela 13).

Para o grupo classificado como mastítica (FR\_Mast), DEL e OP apresentaram risco significativo (Tabela 13). Considerando as vacas com até 100 DEL como a categoria de referência, observou-se que o risco de ser classificada como mastítica aumentou consideravelmente com o avanço da lactação. Vacas entre 100 e 200 DEL apresentaram risco maior (OR=3,70), enquanto que para vacas entre 200 e 300 DEL, o risco foi de (OR=2,76) maior. Esse valor foi ainda mais elevado para vacas com mais de 300 DEL, com risco superior (OR= 9,408), indicando que estágios mais avançados da lactação configuram importante fator de risco para a vaca ser classificada como mastítica (Tabela 13).

Em relação à OP, e tendo primíparas como categoria de referência, o risco de uma vaca ser classificada como mastítica também aumentou com o número de partos. Vacas na segunda ordem de parto apresentaram risco superior (OR=2,10), enquanto vacas na terceira OP ou mais apresentaram este risco mais expressivo de (OR= 4,04) (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de P e estimativa dos fatores de risco das variáveis com risco significativo para grupos de saúde do úbere susceptível e mastítica conforme Bobbo *et al.*, (2020)

Variável	FR_Suscept p-valor	FR_Mast p-valor	Categoria	FR_Suscept OR (IC 95%)	FR_Mast OR (IC 95%)
DEL <sup>1</sup>	<b>0,0061</b>	< <b>0,0001</b>	≤100 <sup>3</sup>		
			100 a 200	0,44 (0,196 a 1,028)	3,70 (1,629 a 8,410)
			200 a 300	0,37 (0,161 a 0,888)	2,76 (1,185 a 6,451)
			>300	0,14 (0,048 a 0,428)	9,40 (3,822 a 23,157)
OP <sup>2</sup>	<b>0,0271</b>	<b>0,0002</b>	1 <sup>3</sup>		
			2	0,34 (0,148 a 0,783)	2,10 (1,037 a 4,279)
			≥3	0,44 (0,213 a 0,940)	4,04 (2,092 a 7,824)
Estação	0,0377	0,2185	Inverno <sup>3</sup>		
			Primavera	0,62 (0,334 a 1,178)	-
			Verão	0,42 (0,221 a 0,996)	-
N	284	284			

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação; <sup>2</sup>OP: ordem de parto; <sup>3</sup>Categoria de referência; FR\_Suscept: Fator de risco para GSU susceptível; FR\_Mast: Fator de risco para GSU mastítica; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança; N: número de observações

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

#### 5.4 Fatores de risco para grupos de saúde do úbere suspeita e mastítica, conforme modelo de Schwarz, *et al.*, (2020b)

Foram investigados os fatores de risco associados à classificação das vacas nos grupos de saúde do úbere suspeita (FR\_Susp) e mastítica (FR\_Mast), conforme os critérios propostos por Schwarz *et al.*, (2020b).

No grupo classificado como suspeitas (FR\_Susp), tanto DEL, quanto a OP foram identificados como fatores de risco estatisticamente significativos, enquanto que a variável Estação não apresentou significância estatística (Tabela 14). Ao considerar vacas com até 100 DEL como categoria de referência, observou-se que o risco de ser classificada como suspeita diminuiu com o aumento do DEL. Vacas entre 100 a 200 DEL apresentaram menor risco (OR=0,55) de serem classificadas como suspeitas, o qual foi ainda mais reduzido para vacas entre 200 e 300 DEL (OR = 0,44) e para aquelas com mais de 300 DEL (OR = 0,23). Em relação à ordem de parto, vacas em segunda lactação apresentaram risco menor (OR= 0,23) de serem classificadas como suspeitas, enquanto que vacas com três ou mais lactações o risco reduziu em (OR=0,37) em relação às primíparas (Tabela 14).

No modelo FR\_Mast as variáveis DEL e OP apresentaram associação ao risco para as vacas serem classificadas como mastíticas (Tabela 14). Considerando como referência as vacas com ≤100 DEL, observou-se um aumento no risco de classificação como mastítica com o avanço da lactação. Vacas entre 100 e 200 DEL apresentaram risco maior (OR=4,57) de serem

classificadas como mastíticas, enquanto para vacas entre 200 e 300 DEL, com risco aumentou (OR=3,93). O aumento do risco foi ainda mais acentuado para vacas com mais de 300 DEL (OR=10,73) comparado ao grupo de referência. Quanto à OP, vacas na segunda lactação apresentaram risco (OR=2,55) superior às primíparas, enquanto aquelas com 3 lactações ou mais o risco foi superior (OR=4,47) que aquelas na primeira OP (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de P e estimativa dos fatores de risco para grupos de saúde do úbere suspeita e mastítica, conforme modelo de Schwarz, *et al.*, (2020b)

Variável	FR_Suscept p-valor	FR_Mast p-valor	Categoria	FR_Suscept OR (IC 95%)	FR_Mast OR (IC 95%)
DEL <sup>1</sup>	<b>0,0240</b>	< <b>0,0001</b>	≤100 <sup>3</sup>		
			100 a 200	0,55 (0,251 a 1,317)	4,57 (2,005 a 10,422)
			200 a 300	0,44 (0,195 a 0,998)	3,93 (1,695 a 9,138)
OP <sup>2</sup>	<b>0,0006</b>	< <b>0,0001</b>	>300	0,23 (0,090 a 0,595)	10,73 (4,328 a 26,62)
			1 <sup>3</sup>		
			2	0,23 (0,107 a 0,503)	2,24 (1,123 a 4,494)
Estação	0,1132	0,2877	≥3	0,37 (0,191 a 0,726)	4,47 (2,326 a 8,597)
			-	-	-
N	284	284			

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação em classes. <sup>2</sup>OP: ordem de parto; <sup>3</sup>Categoria de referência; OR: *Odds Ratio*. IC: intervalo de confiança. FR\_Susp: Fatores de risco para grupo de saúde do úbere suspeita. FR\_Mast: Fatores de risco para grupo de saúde do úbere mastítica.

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

### 5.5 Fatores de Risco para a vaca ser classificada como positiva ao CMT

Para a avaliação dos fatores de risco associados à positividade ao teste de CMT, foram utilizadas 267 observações. Consideraram-se positivas as vacas que apresentaram, em pelo menos um quarto mamário, uma cruz ou mais no teste, conforme os critérios descritos por Constable *et al.*, (2017). Foram avaliados modelos com (CMT\_UT) e sem (CMT\_Geral) as variáveis binárias hiperqueratose, profundidade e sujidade de úbere, visto que estas informações foram coletadas somente em alguns meses, resultando em menor número de observações. Para o conjunto completo também foram realizadas análises incluindo a variável contínua escore de células somáticas, analisadas por citometria de fluxo (ECS\_Citom) ou por bioimpedância (ECS\_EBE), visando avaliar a aderência destas estimativas de CCS aos resultados do CMT.

Pelos valores de P para as variáveis associadas ao risco de um animal ser classificado como positivo no CMT para os diferentes modelos de regressão logística analisados, observa-se que na análise com todos os dados, sem as variáveis relacionadas aos tetos e úbere (CMT\_Geral), além de DEL, a ordem de parto também afetou o risco de CMT positivo (Tabela

15). Vacas entre 200 a 300 DEL apresentaram risco maior de positividade (OR=3,54), em comparação do grupo de referência ( $\leq 100$  DEL), enquanto vacas acima de 300 DEL apresentaram risco ainda mais elevado (OR=7,66) em comparação ao grupo de referência (Tabela 15). Vacas em segunda lactação e aquelas com mais de três partos apresentaram riscos mais elevados de (OR=2,55 e OR=2,49), respectivamente, comparadas às primíparas (Tabela 15).

No modelo que incluiu as variáveis relacionadas ao teto e úbere, apenas DEL e profundidade do úbere apresentaram associação significativa com CMT positivo ( $p < 0,05$ ). Úberes profundos (abaixo do jarrete) aumentaram o risco de uma vaca ser positiva para CMT (OR= 4,63) em relação àquelas com piso do úbere acima do jarrete (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de p das variáveis categóricas dos modelos para determinação dos fatores de risco associados ao resultado positivo no California Mastitis Test (CMT)

Variáveis	CMT_UT	CMT_Geral	CMT_ECS_Citom	CMT_ECS_EBE
DEL <sup>1</sup>	<b>0,0428</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1311	<b>&lt;0,0001</b>
OP <sup>2</sup>	0,6907	<b>0,0215</b>	0,3189	<b>0,0273</b>
HQ <sup>3</sup>	0,9349	-	-	-
PU <sup>4</sup>	<b>0,0038</b>	-	-	-
SU <sup>4</sup>	0,7175	-	-	-
Estação	0,5451	0,6106	0,7636	0,6340
ECS_Citom	-	-	<b>&lt;0,0001</b>	-
ECS_EBE	-	-	-	0,5925
N	141	267	267	267

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação; <sup>2</sup>OP: ordem de parto; <sup>3</sup>HQ: hiperqueratose; <sup>4</sup>PU: profundidade de úbere; <sup>5</sup>SU: sujidade de úbere; <sup>6</sup>Categoria de referência; CMT\_UT: Fatores de risco para CMT positivo com avaliações de teto e úbere; CMT\_Geral: Fatores de risco para CMT positivo sem avaliações de teto e úbere; CMT\_ECS\_Citom: Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS por citometria de fluxo.

CMT\_ECS\_EBE: Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS espectroscopia de bioimpedância elétrica

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

No modelo que incorporou a classificação da ECS obtida por citometria de fluxo como variável contínua, apenas a variável ECS apresentou risco significativo de aumento de CMT positivas (Tabela 16), sendo que o risco de CMT aumentou em 2,397 vezes para cada aumento de uma unidade na ECS. Esta relação intensa entre as variáveis CMT e ECS estimada por citometria de fluxo, eliminando o efeito das demais variáveis causais, demonstra a íntima relação entre estas duas variáveis. Entretanto, quando a ECS foi estimada por EBE, a mesma não influenciou o risco de CMT (Tabela 16), sendo que os efeitos das demais variáveis sobre o

risco de CMT se manteve praticamente inalterado em relação ao modelo que não incluía a ECS (Tabela 16).

Tabela 16 - Estimativa dos fatores de risco para as variáveis com risco significativo para CMT positivo de acordo com os modelos de regressão logística aplicados

CMT UT			
Variável	Categoria	OR	IC 95%
DEL <sup>1</sup>	≤100 <sup>4</sup>		
	100 a 200	0,97	0,335 a 2,885
	200 a 300	1,56	0,504 a 4,845
	>300	<b>4,63</b>	1,325 a 16,226
PU <sup>2</sup>	Alto <sup>4</sup>		
	Baixo	<b>4,63</b>	1,654 a 12,986
CMT GERAL			
Variável	Categoria	OR	IC 95%
DEL <sup>1</sup>	≤100 <sup>4</sup>		
	100 a 200	1,57	0,751 a 3,298
	200 a 300	<b>3,54</b>	1,592 a 7,876
	>300	<b>7,66</b>	3,188 a 18,442
OP <sup>3</sup>	1 <sup>4</sup>		
	2	<b>2,55</b>	1,194 a 5,448
	≥3	<b>2,49</b>	1,243 a 4,996
CMT ECS Citometria			
Variável	Categoria	OR	IC 95%
ECS_Citom		<b>2,397</b>	1,889 a 3,041
CMT ECS EBE			
Variável	Categoria	OR	IC 95%
DEL <sup>1</sup>	≤100 <sup>4</sup>		
	100 a 200	1,560	0,743 a 3,272
	200 a 300	<b>3,535</b>	1,588 a 7,866
	>300	<b>7,667</b>	3,189 a 18,429
OP <sup>3</sup>	1 <sup>4</sup>		
	2	<b>2,519</b>	1,177 a 5,391
	≥3	<b>2,417</b>	1,195 a 4,889

<sup>1</sup>DEL: dias em lactação; <sup>2</sup>PU: profundidade de úbere; <sup>3</sup>OP: ordem de parto; <sup>4</sup>Categoria de referência; OR: *Odds Ratio*. IC: intervalo de confiança CMT\_UT: Fatores de risco para CMT positivo com avaliações de teto e úbere; CMT\_Geral: Fatores de risco para CMT positivo sem avaliações de teto e úbere; CMT\_ECS\_Citometria: Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS por citometria de fluxo.

CMT\_ECS\_EBE: Fatores de risco para CMT positivo, sem avaliação de teto e úbere, incluindo ECS por espectroscopia de bioimpedância elétrica

Fonte: elaborada pelos autores (2025).

## 6 DISCUSSÃO

Programas de monitoramento da saúde da glândula mamária com base na CCS são amplamente utilizados, sendo o ponto de corte de 200.000 células/mL comumente adotado para indicar infecção intramamária. A DMSC, obtida por meio de coletas mensais de CCS, permite acompanhar a evolução da infecção no rebanho, identificando novas infecções, infecções crônicas e curadas Schukken; Kremer (1996). No entanto, essa abordagem não fornece

informações sobre a composição celular do leite. Nesse contexto, novas estratégias, baseadas na CCSD ampliaram o potencial de detecção da mastite subclínica. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar diferentes abordagens para a detecção da mastite subclínica em condições de campo, com foco na relação entre a DMSC e os GSU.

Ao relacionar as categorias da DMSC com os GSU, conforme os modelos descritos por Bobbo *et al.*, (2020) (Tabela 4) e Schwarz *et al.*, (2020b) (Tabela 5), verificou-se concordância fraca e moderada, respectivamente. Essa variação reflete das abordagens distintas entre as metodologias de DMSC e GSU para o diagnóstico da mastite. A dinâmica baseia-se na evolução temporal da CCS, permitindo classificar as vacas como saudias, curadas, com novas infecções ou infecções crônicas, a partir de dois meses consecutivos de monitoramento. Por outro lado, os modelos de GSU realizam uma análise pontual, considerando a CCS do momento da coleta e sua CCSD para classificar as vacas em saudias, susceptíveis ou suspeitas, mastíticas ou crônicas. Embora ambos os modelos de GSU utilizem o mesmo ponto de corte para a CCS (200.000 células/mL), a principal diferença entre eles situa-se nos critérios adotados para a CCSD. Enquanto o modelo de Bobbo *et al.*, (2020) utiliza limiares ajustados de CCSD conforme o estágio da lactação, sendo 66,3% para vacas com até 100 DEL, 69,2% entre 101 e 200 DEL e 69,3% para mais de 200 DEL, os quais foram descritos por Zecconi *et al.*, (2019) o modelo de Schwarz *et al.* (2020b) adota um ponto de corte fixo de 65%, independentemente do DEL.

A proporção de vacas classificadas como saudias pela DMSC, mas identificadas como susceptíveis (GSU\_BOBBO) (Tabela 4) ou suspeitas (GSU\_SCHWARZ) (Tabela 5), evidencia que o comportamento das células difere. A CCS inferior a 200.000 células/mL e CCSD abaixo dos pontos de corte estabelecidos por cada modelo indicam predomínio de macrófagos, o que caracteriza uma glândula mamária saudável. Por outro lado, a elevação da CCSD indica aumento na proporção de neutrófilos PMN e linfócitos, refletindo uma resposta inflamatória inicial (Damm *et al.*, 2017). Essa condição observada em parte das vacas identificadas como saudias ou curadas pela DMSC pode indicar, no caso das saudias, o início de uma resposta inflamatória ainda não refletida na CCS total. Ou pode sugerir diferentes padrões de recuperação imunológica após um quadro inflamatório, no caso de vacas consideradas curadas pela DMSC, mas que ainda exibem um perfil de células de defesa compatíveis com um quadro inflamatório em andamento, mesmo que a CCS já tenha diminuído para valores abaixo de 200.000 células/mL.

Após a invasão tecidual por patógenos, a resposta imune inata é rapidamente ativada, promovendo a migração de neutrófilos para a glândula mamária e elevando sua concentração

no leite (Paape *et al.*, 2002). Esse processo inicia-se entre duas e quatro horas após a infecção, com pico por volta de dez horas, sendo acompanhado pela liberação de citocinas inflamatórias (Alhussien; Dang, 2018). Variações amplas na proporção de neutrófilos (de 4% a 74,4%) foram observadas por Schwarz *et al.*, (2011) mesmo em quartos mamários com CCS < 100.000 células/mL, com os maiores valores registrados em quartos com CCS entre 9.000 e 46.000 células/mL. Mesmo na ausência de confirmação bacteriológica, é possível que os neutrófilos consigam eliminar os patógenos antes de ocorrer um aumento expressivo da CCS, ou ainda que haja liberação intermitente de microrganismos, o que dificulta sua detecção na cultura microbiológica (Pilla *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2011). Esse padrão foi também relatado por Schwarz *et al.*, (2020a) que identificaram infecções intramamárias causadas por patógenos principais sem aumento na CCS, mas com elevação significativa na CCSD. Segundo os autores, a avaliação conjunta da CCS com a CCSD aumenta a sensibilidade diagnóstica para esses patógenos de 78% para 92%.

A identificação de vacas suscetíveis ou suspeitas pelos modelos GSU pode representar um aprimoramento diagnóstico em relação à classificação de vacas sadias ou curadas obtida pela DMSC. Em ambos os casos, alterações na composição celular do leite indicam a presença de um processo infeccioso incipiente. Esse resultado é particularmente relevante, uma vez que vacas classificadas como suspeitas apresentaram 2,77 vezes mais chances de exceder 200.000 células/mL na análise subsequente de CCS (Schwarz *et al.*, 2021), reforçando o valor preditivo dessa categoria para o diagnóstico precoce da mastite subclínica. Além disso, o comportamento da CCS e CCSD observado nos GSU pode variar em função do rebanho e em função do grupo de patógenos presentes na infecção. Kirkeby *et al.*, (2021) avaliaram a dinâmica desses parâmetros em dois rebanhos durante e após a infecção por diferentes grupos de patógenos. No rebanho 1, a CCS manteve-se acima do ponto de corte de 200.000 células/mL por uma média de 91 dias para patógenos principais, 63 dias para secundários e 47,5 dias para outros patógenos. No rebanho 2, esses valores foram de 95, 63 e 63 dias, respectivamente. Para a CCSD, considerando um ponto de corte de 62%, os períodos foram de 63, 59 e 32 dias no rebanho 1, e de 122, 91 e 91 dias no rebanho 2. Esses resultados indicam que, no rebanho 1, a CCS permaneceu elevada por mais tempo que a CCSD, enquanto no rebanho 2 ocorreu o oposto, independentemente do grupo de patógenos. Tal comportamento é relevante, uma vez que nossos dados indicam que vacas classificadas como curadas pela DMSC e simultaneamente como susceptíveis (GSU\_BOBBO, Tabela 4), ou suspeitas (GSU\_SCHWARZ, Tabela 5), apresentaram um comportamento celular diferente (refletido pelas médias de CCS, CCSD e

CCPL mais elevadas) em comparação com vacas saudáveis pela DMSC e também classificadas como suscetíveis pelo GSU.

A classificação predominante no GSU mastítico, tanto no modelo GSU\_BOBBO (Tabela 4) quanto no GSU\_SCHWARZ (Tabela 5), entre as vacas identificadas como novas infecções ou infecções crônicas pela DMSC, também pode refletir, as diferenças metodológicas entre os modelos avaliados. Enquanto a DMSC se baseia em critérios temporais, considerando a evolução da CCS ao longo de dois meses consecutivos, os modelos de GSU utilizam uma análise pontual, centrada na composição celular do leite no momento da coleta.

Do ponto de vista da composição celular, a presença de CCS superior a 200.000 células/mL associada à CCSD acima dos pontos de corte estabelecidos por cada modelo indica uma resposta inflamatória aguda na glândula mamária, com predomínio de neutrófilos PMN, células que podem representar até 92% da CCS total durante o estágio agudo da infecção (Kerli e Harp, 2001; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Paape *et al.*, 2002). Essa condição é corroborada pelos valores elevados da média de CCPL observados nos grupos classificados como mastíticos, frequentemente acima dos limites propostos por Zecconi *et al.*, (2023) como um marcador diagnóstico de infecções intramamárias causadas por patógenos principais, considerando os diferentes estágios da lactação. Os pontos de corte sugeridos para a CCPL são: 163.000 células/mL para vacas entre 5 e 16 dias em lactação (DEL), 53.000 células/mL entre 17 e 43 DEL, e 84.000 células/mL entre 44 e 300 DEL. Assim, os modelos de GSU classificam como mastíticas vacas que, mesmo sendo consideradas crônicas pela DMSC, ainda apresentam uma resposta inflamatória ativa no momento da amostragem. A detecção destes animais pode ser utilizada como indicador para direcionar para diagnóstico microbiológico ou decisões terapêuticas precocemente.

Quando a eliminação bacteriana não é completa, um estágio agudo pode ser seguido por um estágio crônico, representado pelo aumento na proporção de macrófagos (Mondini *et al.*, 2025). Assim, o menor percentual de vacas crônicas nos modelos GSU\_BOBBO (Tabela 4) e GSU\_SCHWARZ (Tabela 5) apesar da CCS elevada, a CCSD abaixo do ponto de corte indica cronicidade na resposta inflamatória, caracterizada pela redução de neutrófilos PMN e aumento relativo nos macrófagos (Damm *et al.* 2017). A identificação desses animais representa um aperfeiçoamento diagnóstico relevante em relação à classificação baseada na DMSC, pois permite a detecção de casos crônicos com base em uma única análise, sem a necessidade de monitoramento em dois meses consecutivos. Esta informação pode constituir uma ferramenta de manejo, útil tanto para direcionar o diagnóstico microbiológico, quanto para subsidiar a seleção de vacas para o descarte. De acordo com Martins *et al.*, (2020), vacas com mastite

subclínica crônica com diagnóstico positivo na cultura microbiológica apresentam redução de até 24,5% na produção de leite e 22,4% na produção total de sólidos, quando comparadas a vacas saudáveis (CCS < 200.000 cél./mL em três análises consecutivas com cultura negativa).

Conforme Schwarz *et al.*, (2021) tanto vacas mastíticas quanto aquelas com infecções crônicas/persistentes apresentaram maior probabilidade de descarte em comparação com vacas sadias ou susceptíveis. No entanto, o risco foi significativamente mais elevado em vacas crônicas, sendo 3,91 vezes maior, enquanto nas vacas mastíticas o risco foi de 2,13. Os autores sugerem que a identificação de vacas crônicas, com base em um único teste que inclua a avaliação da CCSD, pode ser mais eficaz para subsidiar decisões de descarte do que abordagens baseadas exclusivamente na CCS, bem como para a adoção imediata de medidas como diagnóstico microbiológico, segregação, monitoramento direcionado e intervenção terapêutica. De acordo com Cardozo *et al.*, (2015) as estratégias de controle da mastite subclínica devem priorizar a prevenção de novas infecções, a eliminação de casos existentes e a redução da duração das infecções por meio de manejo e terapias adequadas.

Os dois modelos de avaliação dos grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO e GSU\_Schwaz), indicaram elevada similaridade nas interpretações, evidenciada pelo coeficiente Kappa ( $\kappa=0,94$ ) (Tabela 6). As divergências observadas nos grupos de sadias e crônicas se devem aos pontos de corte estabelecidos por cada modelo. Especificamente, o modelo GSU\_BOBBO incorpora limiares de CCSD que variam conforme o DEL, sendo esses pontos de corte mais baixos para vacas com até 100 DEL e mais elevados para aquelas que ultrapassam esse período. Em contrapartida, o modelo de GSU\_SCHWARZ adota pontos de corte fixos, independentes do estágio da lactação.

No modelo descrito por Bobbo *et al.* (2020), os pontos de corte ajustados por DEL foram considerados por apresentarem sensibilidade de 80,1% e especificidade de 83,5%, com acurácia de 82,3%, conforme Zecconi *et al.*, (2019). Essa abordagem buscou minimizar a interferência de variações fisiológicas relacionadas ao estágio da lactação. Os primeiros 100 DEL são marcados por alterações fisiológicas e hormonais, envolvendo o período de transição, em que ocorre uma alteração na função imune (Nigussie, 2018). Nas primeiras semanas pós-parto observa-se redução da atividade funcional dos neutrófilos PMN, com aumento na proporção de células apoptóticas no sangue e de células necróticas no leite (Oostveldt *et al.*, 2001). Além disso, até aproximadamente 70 dias após o parto, as vacas permanecem em balanço energético negativo (BEN), consequência da elevada demanda metabólica para a produção de leite combinada com a ingestão insuficiente de matéria seca Nigussie, (2018), o que também pode comprometer a eficiência da resposta imune. Assim, essas alterações fisiológicas podem

justificar a relevância do uso de categorias específicas por DEL na interpretação dos parâmetros imunológicos do leite.

Por outro lado, Schwarz *et al.*, (2020a) relataram que a combinação de CCSD  $\geq 65\%$  com CCS  $\geq 200.000$  células/mL, utilizada para a identificação de infecções causadas por patógenos principais, resultou em sensibilidade de 92% e especificidade de 66%. Segundo os autores, a priorização da sensibilidade é estratégica para maximizar a detecção de casos de mastite subclínica causados por patógenos relevantes, contribuindo para a prevenção da disseminação no rebanho.

Desta forma, sugere-se que o modelo descrito por Bobbo *et al.*, (2020), ao incorporar o DEL como critério, visa aumentar a especificidade e a acurácia diagnóstica, minimizando a ocorrência de falsos positivos, ao considerar as variações fisiológicas esperadas ao longo da lactação. Em contrapartida, o modelo proposto por Schwarz *et al.*, (2020b) prioriza a sensibilidade diagnóstica, aumentando a chance de identificar vacas infectadas precocemente, mesmo que com maior risco de diagnóstico falso positivo. Essa abordagem pode ser especialmente vantajosa em contextos nos quais a detecção precoce é fundamental para a implementação ágil de medidas de controle e prevenção da mastite subclínica. As afirmações destes autores corroboram com os resultados do presente estudo, no qual, das vacas consideradas como sadias pelo modelo proposto por Bobbo *et al.*, (2020), 20,73% foram consideradas como suspeitas pelo modelo proposto por Schwarz *et al.*, (2020b) sendo que este grupo apresenta valores médios de CCS, CCSD e CCPL levemente superiores em relação às 79,27% de vacas consideradas como sadias em ambas as metodologias (Tabela 6).

As divergências observadas entre as classificações da DMSC obtidas pela CF e pela EBE indicam que essas metodologias avaliam de formas distintas a resposta inflamatória da glândula mamária (Tabela 7). Quando incluímos na análise de fatores de risco associados à positividade ao teste CMT o escore de células somáticas (ECS) como variável contínua (Tabela 15), observamos que a ECS avaliada por CF (ECS\_Citom), apresentou um risco significativo para CMT positivo sendo 2,39 de vezes maior para cada aumento na unidade de ECS\_Citom. Por outro lado, quando o ECS foi estimado por bioimpedância (ECS\_EBE), esta variável não demonstrou influência significativa sobre o risco de CMT positivo. Além disso, no modelo ECS\_EBE, DEL e OP aumentaram o risco para CMT positivo nas mesmas proporções que o modelo CMT\_Geral. Essa persistência dos efeitos de DEL e OP, em contraste com a não significância do ECS\_EBE, indica que a contribuição preditiva da bioimpedância para o risco de CMT positivo foi limitada, e que ela não reflete a mesma informação biológica ou poder diagnóstico que o CMT ou a citometria de fluxo em relação aos demais fatores (Tabela 16).

Na análise da CCS por CF, as amostras são processadas conforme protocolos que incluem a adição de corantes fluorescentes, como brometo de etídio, iodeto de propídio ou laranja de acridina que promovem marcação do DNA celular. A quantificação das células é feita com base na detecção do DNA por meio do citômetro de fluxo (Pelvan; Unluturk, 2015). Essa técnica é reconhecida pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e adotada pela RBQL para a contagem de células somáticas (BRASIL, 2018), conforme estabelecido pela norma ISO 13366-2 (2008), sendo calibrada com base no método-padrão descrito na ISO 13366-1 (2006).

Por outro lado, a análise pela EBE é baseada no princípio aplicar uma corrente elétrica de diferentes frequências a um material biológico e mensurar a impedância resultante (Bertemes-Filho, 2018). Um organismo vivo é composto por fluidos intra e extracelulares que atuam como condutores elétricos, e por membranas celulares que atuam como elementos capacitivos, limitando a passagem da corrente. Em frequências mais baixas, usualmente inferiores a 100 kHz, a corrente elétrica flui predominantemente através dos fluidos extracelulares, enquanto em frequências mais elevadas, entre 500 e 800 kHz, a corrente circula tanto nos fluidos extracelulares quanto nos intracelulares (Lukaski *et al.*, 1985). Em nosso estudo, as frequências variaram de 0,1 a 1000 kHz. Segundo Bertemes Filho, (2018) o fluxo de corrente elétrica no interior da célula está provavelmente relacionado aos constituintes da membrana celular, formada predominantemente por proteínas e lipídeos hidrofóbicos insolúveis em água. Assim, conforme relatado por Zuffo (2021), esses constituintes de membrana, componentes do leite, bem como as próprias células que compõem as células somáticas podem interferir na metodologia baseada em EBE.

Zuffo (2021) avaliou a correlação entre a CCS analisada por EBE e por microscopia óptica, considerada método de referência. Amostras de leite de tanque de expansão e de animais individuais foram analisadas em triplicata e comparadas com os resultados de cinco versões de calibração de um equipamento comercial (EBE0, EBE1, EBE2, EBE3 e EBE4) para amostras individuais, e três versões (EBE0, EBE1 e EBE2) para amostras de tanque. Além disso, também foram avaliadas as correlações entre a metodologia de referência e os resultados obtidos por citometria de fluxo em dois laboratórios distintos (LAB 1 e LAB 2), ambos vinculados a RBQL. As amostras individuais apresentaram correlações positivas com todas as versões de calibração avaliadas, com coeficientes de 0,48 (EBE0), 0,46 (EBE1), 0,45 (EBE2), 0,40 (EBE3) e 0,46 (EBE4), sendo a calibração EBE0 a que apresentou melhor desempenho. Para as amostras de tanque, os coeficientes de correlação foram menores, com valores de 0,31 (EBE0) e 0,27 (EBE1), enquanto a versão (EBE2) não apresentou correlação significativa. Já os resultados obtidos por citometria de fluxo para amostras individuais apresentaram correlações superiores

com a metodologia de referência, de 0,92 para o LAB 1 e 0,94 para o LAB 2, enquanto que amostras de tanque apresentaram correlações de 0,84 (LAB 1) e 0,82 (LAB 2). Os autores concluíram que a técnica apresenta potencial de uso para análise em leite, considerando as correlações encontradas com o método de referência.

Embora em nosso estudo os resultados não tenham sido comparados diretamente à metodologia de referência baseada em microscopia óptica, a elevada correlação entre a citometria de fluxo e o método de referência identificado em estudos anteriores (Zuffo 2021), respalda a confiabilidade da CF. Nesse contexto, as discordâncias observadas em nosso estudo (Tabela 7) entre as categorias da DMSC obtidas por meio da EBE e pela CF, bem como a ausência de um comportamento consistente superior em qualquer categoria da DMSC obtidas por meio da EBE indicam que o método em seu estágio atual de desenvolvimento ainda não se mostrou uma tecnologia viável para o diagnóstico de mastite subclínica em condições de campo.

Quando relacionados aos resultados negativos do CMT (Tabela 8), observou-se que as vacas classificadas como novas infecções e infecções crônicas, segundo a DMSC apresentavam média da CCS acima do limiar de 200.000 células/mL, reconhecido para diferenciar glândula mamária infectada de não infectada (IDF, 2013). Além disso, essas vacas também apresentaram elevados percentuais de CCSD, mesmo quando negativas para CMT, indicando uma resposta inflamatória ativa. Esses achados sugerem que o CMT não foi eficaz para detectar 18,48% de casos potencialmente positivos.

Por outro lado, vacas com resultado positivo ao CMT, mas classificadas como sadias ou curadas pela DMSC, apresentaram CCS abaixo de 200.000 células/mL (Tabela 8), porém com média de CCSD mais elevada para curadas (73,56%) em relação às sadias (66,19%), indicando aumento de neutrófilos e linfócitos, compatível com estágio inicial de inflamação (Schwarz *et al.*, 2020). Assim, os resultados positivos ao CMT nesses grupos mostram maior concordância com o perfil celular inflamatório do que com a classificação baseada apenas na CCS temporal, sugerindo que o teste pode refletir alterações imunológicas mesmo antes da elevação da CCS total.

As divergências observadas entre os métodos podem ser parcialmente atribuídas às diferenças metodológicas. A DMSC baseia-se na variação da CCS ao longo de dois meses consecutivos e utiliza amostras compostas da ordenha completa. Quando amostras compostas de leite são usadas, algumas infecções subclínicas não são detectadas porque a CCS da amostra será reduzida pela diluição com leite de quartos saudáveis com menor proporção de células somáticas (Ruegg; Reinemann, 2002). Em contraste, o CMT avalia apenas o leite cisternal,

fração que representa cerca de 35% da CCS total em quartos mamários com CCS acima de 100.000 células/mL (Sarikaya; Bruckmaier, 2006). Além disso, neste estudo, considerou-se positivo qualquer quarto com pelo menos uma cruz no CMT, o que pode superestimar a detecção ao não refletir a condição da glândula como um todo.

A associação significativa entre o CMT e os modelos de GSU\_BOBBO e GSU\_SCHWARZ (Tabelas 9 e Tabela 10) também evidencia a utilidade do CMT como ferramenta auxiliar no diagnóstico da mastite subclínica. No entanto, diversos animais com CMT negativo foram classificados como suscetíveis, mastíticos ou crônicos pelos modelos GSU, cujos critérios incluem a CCSD. Esses modelos, cuja sensibilidade e especificidade foram de 80,1% e 83,5% (Zecconi *et al.*, 2019; Bobbo *et al.*, 2020) e 92% e 66% (Schwarz *et al.* 2020b), respectivamente, demonstrando maior assertividade na identificação de alterações na composição celular do leite, mesmo na ausência de aumento na CCS ou positividade ao CMT. Além disso, a relação entre os valores de CCS e CMT podem não ser precisos devido ao alto grau de variabilidade de CCS em cada pontuação de CMT (Ruegg; Reinemann, 2002).

Vacas com CMT positivo e classificadas como mastíticas apresentaram os maiores valores médios de CCS, CCSD e CCPL, demonstrando alta concordância entre os métodos e sugerindo que composição celular presente contribui para a reatividade ao teste. Embora Huang; Kusaba (2022) tenham relatado que elevadas proporções de macrófagos também podem elevar a pontuação do CMT, mesmo com CCS reduzida, esse padrão não foi predominante em nossos estudos, o que reforça a hipótese de que a reatividade ao CMT neste estudo esteve mais associada à presença de neutrófilos e ao perfil inflamatório agudo.

Para o estudo dos fatores de risco para as metodologias de identificação de mastite subclínica, foram analisados os efeitos de fatores de risco de mastite já consagrados na literatura e anteriormente estudados em um grande conjunto de dados pelo nosso grupo de pesquisa para o risco de novas infecções e infecções crônicas na dinâmica da DMSC (Cardozo *et al.*, 2015). O objetivo foi avaliar a aderência destes fatores de risco com os diferentes métodos de detecção de mastite estudados.

O estágio de lactação influenciou significativamente o risco de resultados positivos ao CMT, a ocorrência de infecções crônicas pela DMSC, bem como a classificação das vacas nos GSU suscetível e mastítica, conforme os modelos de Bobbo *et al.*, (2020), e suspeito e mastítico, segundo Schwarz *et al.* (2020b). Observou-se ainda uma tendência do DEL para novas infecções intramamárias pela DMSC.

Os resultados indicam que vacas em estágios mais avançados da lactação apresentam maior probabilidade de mastite subclínica, evidenciada pelo maior risco de serem positivas ao

CMT a partir de 200 DEL (Tabela 16). O risco para novas infecções intramamárias apresentou tendência a partir dos 300 DEL (Tabela 11), enquanto o risco de infecções crônicas aumentou progressivamente desde 100 até mais de 300 DEL (Tabela 12).

O estágio de lactação aumentou substancialmente o risco de vacas serem diagnosticadas como mastíticas pelos grupos de saúde do úbere (GSU\_BOBBO e GSU\_SCHWARZ), com aumento progressivo em todas as classes de DEL avaliadas. Os valores de OR foram superiores no modelo proposto por Schwarz *et al.*, (2020b) (Tabela 14), quando comparados aos de Bobbo *et al.*, (2020) (Tabela 13). Por outro lado, o risco de novas infecções intramamárias pela DMSC aumentou somente após 300 DEL (OR = 2,56) (Tabela 11), quando as médias de CCS e CCSD foram 723.125 (células/mL) e 74,11%, respectivamente (dados não apresentados). Esses resultados corroboram com estudos anteriores sobre o impacto do DEL no aumento da CCS. Conforme Schunig *et al.*, (2024), vacas da raça Holadesa e Jersey com mais de 305 DEL apresentaram risco maior do que àquelas com até 105 DEL (OR = 1,99 e 1,9), respectivamente. No entanto, ao utilizar GSU para diagnosticar mastite subclínica, detecta-se um risco aumentado em estágios mais precoces da lactação.

Nossos resultados referentes às infecções crônicas pela DMSC (Tabela 12), estão de acordo com estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, reportados por Cardozo *et al.*, (2015), no qual foi observado risco aumentado de mastite subclínica crônica com o avanço da lactação. Vacas com 101 a 200, 201 a 300 e mais de 300 dias em lactação apresentaram razões de chance 2,6, 5,46 e 4,41 vezes maiores, respectivamente, em comparação àquelas com menos de 100 dias em lactação. À medida que a lactação avança, há um incremento progressivo na CCS e na migração de neutrófilos para o leite. Essa resposta inflamatória com o avanço da lactação é um indicativo de exposição a patógenos e infecção intramamária, principalmente por patógenos contagiosos a partir de vacas infectadas subclínicamente (Ruegg; Pantoja, 2013).

Schwarz *et al.*, (2020b) relataram elevação progressiva na CCS e CCSD ao longo da lactação, com valores mais baixos entre 28–40 DEL e aumentos constantes até o final da lactação. O estudo também mostrou incremento na proporção de vacas classificadas como mastíticas, de 18% para animais com menos de 100 DEL, para 21,7% em vacas com mais de 400 DEL, evidenciando a influência do estágio da lactação sobre o status inflamatório da glândula mamária. Mondini *et al.*, (2025) avaliaram fatores de risco para a CCS acima de 100.000 células/mL, definido como ponto de corte. Estágio de lactação foi um fator de risco, sendo que o período que determinou o aumento da CCS (acima do limiar estabelecido), foi entre 121 e 180 DEL. Os autores também detectaram que maiores percentuais de neutrófilos

(>63%) e linfócitos (>14%), e baixos percentuais de macrófagos aumentaram a possibilidade de observar aumento de CCS no leite.

No entanto, DEL apresentou influência oposta para o risco de vacas serem classificadas como susceptíveis (GSU\_BOBBO) e suspeitas (GSU\_SCHWARZ), com risco sendo reduzido à medida que a lactação aumentou. Na classe de até 100 DEL, a média da CCS e da CCSD foi de 251.000 células/mL e 66,23%, respectivamente (dados não apresentados), valores inferiores aos estágios mais adiantados de lactação, sendo que uma parcela maior das vacas, apesar de não apresentar CCS elevada ultrapassou os pontos de corte para CCSD, sendo classificadas nos GSU susceptíveis ou suspeitas. O aumento no percentual de neutrófilos PMN e linfócitos, indica uma resposta inflamatória em estágios iniciais (Damm, *et al.*, 2017), que pode ter ocorrido em resposta a exposição a patógenos, mas sem a detecção pela CCS, o que pode levar à detecção nos estágios subsequentes da lactação, caso a infecção não tenha sido eliminada.

Complementarmente, Schwarz *et al.*, (2020b) verificaram que a maioria das vacas classificadas como saudáveis ou suspeitas se concentrava nos estágios iniciais da lactação, com 61% e 19,3% dos animais com menos de 100 DEL, respectivamente. A frequência nessas categorias diminuiu de forma contínua com o avanço da lactação, atingindo 54,3% e 15% quando o DEL era superior a 400 dias, sugerindo que o estágio da lactação influencia diretamente o perfil celular imune e, conseqüentemente, a classificação nos modelos GSU.

O risco aumentado para vacas serem classificadas como suspeitas nos GSU nas fases iniciais da lactação, pode estar relacionado às alterações na função imune que ocorre durante esses períodos. Os primeiros 100 dias de lactação coincide com algumas alterações fisiológicas especialmente até os primeiros 70 dias pós-parto e caracteriza-se por um desequilíbrio entre a alta demanda energética para síntese de leite e a ingestão insuficiente de matéria seca, resultando em BEN (Nigussie, 2018). Nessa fase, os níveis plasmáticos de glicose tendem a diminuir, o que pode comprometer a funcionalidade das células imunes, uma vez que a glicose é a principal fonte de energia para macrófagos e neutrófilos. Esse déficit energético pode levar à redução da quimiotaxia, da atividade fagocitária e da capacidade de resposta inflamatória (Chase, 2022).

A ordem de parto também afetou o risco de resultados positivos ao CMT (Tabela 15), para infecções crônicas na DMSC (Tabela 12), bem como para os grupos de saúde do úbere, susceptível e mastítica conforme Bobbo *et al.*, (2020) (Tabela 13) e suspeita e mastítica (Schwarz *et al.*, 2020b) (Tabela 14).

No presente estudo, a OP não apresentou associação com o risco de novas infecções intramamárias segundo a DMSC, possivelmente devido ao número reduzido de observações,

visto que esta variável já foi descrita anteriormente em um estudo com grande conjunto de dados realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com risco aumentado a partir da quarta OP (OR= 1,71), em relação às primíparas (Cardozo *et al.*, 2015). No entanto, verificou-se que o risco de classificação como mastítica pelos modelos GSU\_BOBBO e GSU\_SCHWARZ aumentou progressivamente com a OP, tanto para vacas em segunda lactação quanto para aquelas com três lactações ou mais.

O efeito da ordem de parto sobre a CCS e CCSD também foi descrita por (Schwarz *et al.*, 2020b), que verificaram que o GSU mastítica aumentou da proporção de 12,8% para 31,3% quando a ordem de parto passou de 1 para  $\geq$  a 4. Isto pode ser explicado pelo fato de que vacas mais velhas e com maior ordem de parto podem apresentar um declínio na resistência imunológica, facilitando a entrada e multiplicação de patógenos no canal da extremidade do teto (Ruegg; Pantoja, 2013).

No entanto, o efeito da OP nos grupos de saúde do úbere susceptível (GSU\_BOBBO) (Tabela 13) e suspeita (GSU\_SCHWARZ) (Tabela 14), apresentou redução a partir da segunda lactação com relação às primíparas. Este efeito foi contrário ao observado nos grupos de saúde do úbere mastítica pelos dois modelos referidos, em que houve um aumento progressivo a partir da segunda lactação. Estes resultados indicam que embora as primíparas possam enfrentar desafios inerentes ao início da lactação e as mudanças fisiológicas, possuem capacidade imunológica diferente das múltiparas, não aumentando substancialmente a CCS. Segundo Chase *et al.*, (2022), os neutrófilos do leite de vacas primíparas apresentam maior viabilidade e produção de espécies oxidativas reativas do que vacas mais velhas, o que torna estes animais menos vulneráveis a infecção.

Segundo Schwarz *et al.*, (2021), vacas suspeitas podem apresentar infecção intramamária, mesmo por patógenos principais, sem aumento na CCS total. Em alguns casos o sistema imune é capaz de combater a infecção, enquanto em outros, esses animais podem apresentar aumento na CCS na próxima análise de CCS individual, resultando na posterior classificação como mastíticas. Considerando que, segundo os resultados da pesquisa de Schwarz *et al.*, (2021) vacas classificadas como suspeitas apresentaram 2,77 vezes mais chances de exceder 200.000 células/mL na análise subsequente de CCS, nossos resultados reforçam a importância da identificação precoce de vacas suscetíveis ou suspeitas, especialmente entre primíparas, com o objetivo de direcioná-las à confirmação por diagnóstico microbiológico e à adoção de medidas eficazes de prevenção e controle da mastite.

No presente estudo, a ordem de parto também esteve associada ao aumento do risco de mastite crônica, com OR de 3,27 e 3,67 para vacas na segunda e terceira lactação,

respectivamente, em comparação às primíparas (Tabela 12). De forma semelhante, Cardozo *et al.*, (2015) relataram um aumento no risco de infecções crônicas a partir da terceira lactação, com valores de OR de 2,04 e 1,81 para vacas com terceira e quarta ordem de parto ou mais, respectivamente, com relação às primíparas.

Nos modelos que incluíram variáveis relacionadas às características do úbere e dos tetos para avaliar o risco de novas infecções intramamárias (Tabela 11), infecções crônicas (Tabela 12) e de positividade ao CMT (Tabela 16), apenas a profundidade do úbere apresentou associação significativa com a positividade ao CMT ( $P = 0,0038$ ), conforme apresentado na Tabela 16. As demais variáveis analisadas, sendo hiperqueratose e sujidade do úbere não apresentaram associação significativa com as condições de saúde do úbere investigadas ( $P > 0,05$ ).

Observamos que vacas com o piso do úbere (profundidade) abaixo da linha do jarrete, apresentaram risco 4,63 vezes maior de serem classificadas como positivas ao CMT (Tabela 16). Essa maior suscetibilidade à mastite subclínica pode estar relacionada ao aumento da exposição das extremidades dos tetos a microrganismos ambientais, sendo relatado aumento de 1,73 vezes com relação a animais com úbere acima do jarrete (Coentrão *et al.*, 2008). Cardozo *et al.*, (2015) verificaram que o risco para novas infecções intramamárias aumentou 1,66 e 2,42 vezes para vacas com o úbere no jarrete e abaixo da linha do jarrete, respectivamente, em comparação com vacas com o úbere acima da linha do jarrete. Além disso, o risco para infecções crônicas aumentou 1,4 vezes mais para vacas com úbere abaixo do jarrete.

Nossos resultados contrastam com estudos anteriores, nos quais a hiperqueratose e a sujidade do úbere foram associadas ao aumento do risco de mastite subclínica. Cardozo *et al.*, (2015) relataram que vacas com escore médio de hiperqueratose superior a 3 apresentaram risco 1,59 vezes maior para novos casos de mastite subclínica, e que aquelas com úberes classificados como “muito sujos” apresentaram 1,53 vezes mais chances de desenvolver infecção crônica. A ausência de associação significativa dessas variáveis em nosso estudo pode estar relacionada ao número reduzido de observações nos modelos aplicados, limitando a detecção de associações estatisticamente significativas.

## 7 CONCLUSÃO

A utilização conjunta da CCS e CCSD permite diferenciar o diagnóstico da mastite subclínica, classificando as vacas em grupos de saúde do úbere (GSU) em uma única análise individual do leite. Enquanto a avaliação temporal em dois meses consecutivos classifica como

sadias ou curadas todas as vacas com menos de 200.000 células/mL no mês atual, os GSU conseguem identificar, dentro desses mesmos grupos, animais suscetíveis ou suspeitos. Além disso, os GSU permitem reconhecer casos de mastite subclínica crônica com base em apenas uma análise, representando um avanço no diagnóstico da doença. As categorias da DMSC apresentam concordância fraca com o GSU\_Bobbo e moderada com o GSU\_Schwarz, evidenciando que cada abordagem avalia a mastite subclínica (MSC) de maneira distinta.

A CCS estimada por EBE, em seu estágio atual de desenvolvimento metodológico, ainda não demonstra ser uma ferramenta viável para o diagnóstico de mastite subclínica em condições de campo, não havendo concordância entre os modelos.

O CMT é um método rápido de diagnóstico de mastite subclínica, porém quando utilizado como método único de diagnóstico apresenta algumas discordâncias em relação à DMSC e aos GSU.

Úberes profundos, estágio avançado da lactação e maior ordem de parto apresentam maior risco para resultados positivos no CMT.

Lactação avançada e maior ordem de parto aumenta o risco de infecções crônicas na DMSC e de GSU mastítica, enquanto vacas em estágios mais avançados da lactação e maior ordem de parto apresentam menor risco para o GSU susceptível / suspeita.

Os GSU definidos por Bobbo *et al.*, (2020) e por Schwarz *et al.*, (2020b), apresentam elevada concordância. Porém, o GSU\_Bobbo, ao considerar o DEL na definição dos pontos de corte, adota uma abordagem mais conservadora, ajustada às variações fisiológicas da lactação. Em contraste, o GSU\_Schwarz, com ponto de corte fixo, favorece a detecção precoce da mastite, especialmente ao identificar animais suscetíveis. Essa abordagem pode ser mais eficaz em rebanhos com alta prevalência de patógenos principais ou no diagnóstico pós-parto, além de ser de fácil aplicação em condições de campo por não depender do registro do DEL.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A. *et al.*, Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>

ALESSIO, D. *et al.*, Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. **Livestock Science**, v. 252, p. 1 - 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104678>

ALHUSSIEN, M. N.; DANG, A. K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 562–577, 2018. Disponível em: [www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/1.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/1.pdf)

- ARRUDA JUNIOR, L. C. **Variáveis relacionadas a não conformidades em qualidade do leite: baixa acidez titulável e baixo teor de extrato seco desengordurado.** 2018. Tese (Doutorado acadêmico em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.
- BARNUM, D A; NEWBOULD, F H S. The use of the California Mastitis Test for the detection of bovine mastitis. **The Canadian Veterinay Journal**, v. 2, p. 83–90, 1960.
- BELOTI, Vanerli. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade.** 1. ed. Londrina: Planta, 2015.
- BERTEMES-FILHO, P. Electrical Impedance Spectroscopy *In*: Simini, F., Bertemes-Filho, P. **Bioimpedance in Biomedical Applications and Research.** 1. ed. Springer, Cham. 2018. p. 5- 27. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74388-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74388-2_2)
- BISUTTI, V. *et al.* Effect of intramammary infection and inflammation on milk protein profile assessed at the quarter level in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 3, p. 1413 - 1426, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23818>
- BISUTTI, V. *et al.* Impact of somatic cell count combined with differential somatic cell count on milk protein fractions in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 8, p. 6447–6459, 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22071>
- BOBBO, T.; PENASA, M.; CASSANDRO, M. Combining total and differential somatic cell count to better assess the association of udder health status with milk yield, composition and coagulation properties in cattle. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 697–703, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1784804>
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 76 de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União.** Brasília: seção 1, Brasília, DF, p. 9, 30 nov. 2018.
- BREEN, J. *et al.* Hyperkeratosis of the teat-end. **Livestock**, v. 11, ed. 5, p. 19–26, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2006.tb00042.x>
- BREITENBACH, P. **Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica como ferramenta de avaliação da composição do leite e CCS.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Educação Superior do Oeste - Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, 2021.
- CARDOZO, L. L. **Identificação dos fatores de risco associados a ocorrência de hiperqueratose na extremidade dos tetos em rebanhos leiteiros.** Tese (Doutorado acadêmico em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.
- 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**, v. 98, n. 11, p. 7675–7685, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8913>
- CHASE, C. C. L. *et al.* **A imunidade bovina. Uma abordagem prática da imunologia e da vacinologia.** Espanha: Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S. L., 2022.
- CHE TRI, D. *et al.* Relationship of Udder, Flank and Lower Leg Hygiene Scores with Elevated Somatic Cell Count and Prevalence of Subclinical Mastitis in Dairy Cow. **Annual**

**Research & Review in Biology**. v. 39, n. 8, p. 27–38, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/arrb/2024/v39i82106>

CLABBY, C. *et al.* Evaluation of test-day milk somatic cell count to predict intramammary infection in late lactation grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 106, n. 7, p. 4991–5001, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22627>

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLÁMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. **Animals**. v. 10, n. 12, p. 2212, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10122212>

COENTRÃO, C. M. *et al.* Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 283–288, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200001>

CONSTABLE, P. D. *et al.* **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 11. ed. Missouri: Elsevier, 2017.

CÓRDOVA, H. De A. **Produção e qualidade do leite, frequência de ordenha, profundidade do úbere e comportamento de vacas da raça Holandesa em ordenha robótica**. Tese (Doutorado acadêmico em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.

COSTA, A. *et al.* Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5883–5898, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15955>

COHEN, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, 1960.

DAMM, Malin *et al.* Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4926–4940, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12409>

DANIELI, B. **Fatores de risco associados a elevada contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros**. Tese (Doutorado acadêmico em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2024.

DE VliegHER, S.; OHNSTAD, I.; PIEPERS, S. Management and prevention of mastitis: A multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 1214–1233, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61893-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61893-8)

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225–237, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(91\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0167-5877(91)90006-N)

DOVAL, J. P.; ARTEAGA, ZAMBRANO, J. C. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 62–95, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21615/cesmvz.5231>

EBRAHIMIE, E. *et al.* A large-scale study of indicators of sub-clinical mastitis in dairy cattle by attribute weighting analysis of milk composition features: Highlighting the predictive power of lactose and electrical conductivity. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 2, p. 193–200, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022029918000249>

FENG, W.; ZHENG, X. Comparing techniques for detecting the number of somatic cells in raw milk. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 5–6, p. 653–657, 2005. DOI: 10.1007/s00217-004-1084-1

FOX, L. K.; SHOOK, G. E.; SCHULTZ, L. H. Factors Related to Milk Loss in Quarters with Low Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 8, p. 2100–2107, 1985.

GONÇALVES, J. L. *et al.* Effect of bovine subclinical mastitis on milk production and economic performance of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 60, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2023.208514>

GONÇALVES, J. L. *et al.* Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1855–1863, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17834>

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, 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13286

GONZÁLEZ, F. H D; DÜRR, W.; FONTANELI, R. S. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de vacas Leiteiras**. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, 2001. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/26656>

GRIMNES, S.; MARTINSEN, O. G. **Bioimpedance and Bioelectricity Basics**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

HUANG, C.; KUSABA, N. Association between differential somatic cell count and California Mastitis Test results in Holstein cattle. **JDS Communications**, v. 3, n. 6, p. 441–445, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S266691022200120X>.

IDF - International Dairy Federation. **Bulletin off the International Dairy Federation 466/2013**, 2013. Disponível em: [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org).

ISO - International Organization for Standardization. 13366-1/IDF 148. **Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method (Reference method)**. 2006.

ISO - International Organization for Standardization. 13366-2/IDF 148-2. **Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. 2008.

ISO - International Organization for Standardization. 9622:2013/IDF 141:2013. **Milk and liquid milk products — Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry**. 2013.

- KANDEEL, S. *et al.* Evaluation of 3 esterase tests for the diagnosis of subclinical mastitis at dry-off and freshening in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1402–1416, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14345>
- KERLI, M. E.; HARP, J. A. Immunity in The Mammary Gland. **Veterinary Clinics of North America-food Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 495–516, 2001. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30003-7
- KIRKEBY, C. *et al.* Differential somatic cell count as an additional indicator for intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1759–1775, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16523>
- KIRKEBY, C. *et al.* Dynamics of somatic cell count (SCC) and differential SCC during and following intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3427–3438, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19378>
- LE MARÉCHAL, C. *et al.* Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 3, p. 247–282, 2011. Disponível em: <https://hal.science/hal-00930618v1>
- LI, N. *et al.* Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 6, p. 517–538, 2014. DOI: 10.1007/s13594-014-0176-3.
- LUKASKI, H. C; JOHNSON, P. E.; LYKKEN, G. I. **Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body**, 1985. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/41/4/810/4691611> . .
- MACHADO, S. C. *et al.* Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 4, p. 340–347, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000400010>
- 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.
- MATTIELLO, C. A. *et al.* Rendimento industrial, eficiência de fabricação e características físico-químicas do queijo colonial produzido de leite com dois níveis de células somáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1916–1924, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9908>
- MEIN, G. A. *et al.* Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. **Written for the AABP-NMC. International Symposium on Mastitis and Milk Quality**. n. 5, 2001. Disponível em: <http://www.uwex.edu/milkquality/>.
- MIDDLETON, J. R. *et al.* Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. **Javma-journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 3, p. 419–423, 2004.

- MONDINI, S. *et al.* Factors influencing somatic cell count and leukocyte composition in cow milk: a field study. **Journal of Dairy Science**, v. 8, n. 3, p. 2721 - 2733, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25357>
- MORO, A. B. *et al.* Prediction of lamb body composition using in vivo bioimpedance analysis. **Meat Science**, v. 150, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.013>
- McHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia Medica**, v. 22, n. 3, p. 276-82, 2012.
- NERO, L. A.; DE CARVALHO, A. F. **Raw Milk Balance Between Hazards and Benefits**. 1. ed. Elsevier, 2019.
- NICKERSON, S. C. Immunological Aspects of Mammary Involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1665–1678, 1989. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79278-X
- NIGUSSIE, T. A. Review on the Role of Energy Balance on Reproduction of Dairy Cow. **Journal of Dairy Research and Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.24966/DRT-9315/100003
- NORO, G. *et al.* Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 3, p. 1129–1135, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000400026>
- OOSTVELDT, K. V. *et al.* Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. **Veterinary Research**, v. 32, n. 6, p. 617–622, 2001. Disponível em: <http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2001143>.
- OVIEDO-BOYSO, J. *et al.* Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409, 2007. DOI: 10.1016/j.jinf.2006.06.010
- PAAPE, M. *et al.* Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109–121, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1020343717817>
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16811>
- PANTOJA, J. C. F.; HULLAND, C.; RUEGG, P. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 139–148, 2009. DOI:10.3168/jds.2008-1477
- PEGOLO, S. *et al.* Associations between differential somatic cell count and milk yield, quality, and technological characteristics in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4822–4836, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19084>
- PEGOLO, S. *et al.* Associations between subclinical intramammary infection and milk fatty acid profile at the quarter level in Holstein cattle. **Animal**, v. 17, n. 10, p. 100978–100978, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100978>

PELVAN, M.; UNLUTURK, S. Application of Flow Cytometry and Fluorescence Techniques in Somatic Cell Analysis of Raw Milk. **International Journal of Food Processing Technology**, v. 2, p. 11-16, 2015.

PEREIRA, A. R. *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 121 - 124, 1999.

PILLA, R. *et al.* Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4410–4420, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5331>

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The Determination of the Number of Body Cells in Milk by a Direct Method. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 632–640, 1910. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/30071855>.

REINEMANN, D. J; COOK, N. B. **A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene**, 2007.

RUEGG, P. Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 47–73, 2003. DOI: 10.1016/s0749-0720(02)00078-6

RUEGG, P. Managing Mastitis and Producing Quality Milk. *In*: CARLOS A. RISCO; RETAMAL, P. M. **Dairy Production Medicine**, John Wiley & Sons, p. 207 - 232, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470960554.ch18>

RUEGG, P.; PANTOJA, J. C. F. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 52, p. 101 - 107, 2013.

RUEGG, P.; REINEMANN, D. J. Milk Quality and Mastitis Tests. **The Bovine Practitioner**, v. 36, n. 1, p. 41–54, 2002.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite - Desafios e soluções**. 1ª ed. Pirassununga - SP: Edição dos autores, 2019.

SARGEANT, J. M. *et al.* Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018–2024, 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74645-0

SARIKAYA, H.; BRUCKMAIER, R. M. Importance of the sampled milk fraction for the prediction of total quarter somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4246–4250, 2006. DOI:10.1017/S0022029905001317

SCANDURRA, G. *et al.* UHT Milk Characterization by Electrical Impedance Spectroscopy. **Applied Sciences, Switzerland**, v. 12, n. 15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app12157559>

SCHALM, O W; NOORLANDER, D. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199–204, 1957.

SCHEID, A. L. **Variáveis que afetam a estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável: uma abordagem multivariada**. Tese (Doutorado acadêmico em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2024.

SCHEPERS, A. *et al.* Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1833–1840, 1997. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76118-6.

SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2503–2511, 2002. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74333-6.

SCHUKKEN, Y. H.; KREMER, D. J. Monitoring udder health: objectives, material and methods. Herd health and production management in dairy practice. *In: Herd Health and Production Management in Dairy Practice*. 1. ed. Wageningen Academic Publishers: Wageningen Pers, 1996. p. 546.

SCHUMACHER, Larissa Luísa *et al.* Bioelectrical impedance analysis (bia) in animal production: Review. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v. 12, n. 2, p. 553–572, 2021.

SCHUMACHER, L. L. *et al.* Use of electrical bioimpedance analysis to evaluate the quality of bovine raw milk. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 49, n. 4, p. 727–734, 2019.

SCHUNIG, R. *et al.* Cow-level risk factors associated with the increase in somatic cell count and the occurrence of subclinical mastitis in Brazilian Holstein and Jersey dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, 2024.

SCHWARZ, D. *et al.* Associations between different udder health groups defined based on a combination of total and differential somatic cell count and the future udder health status of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 192, p. 105374–105374, 2021. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105374.

SCHWARZ, D. *et al.* Evaluation of the new differential somatic cell count parameter as a rapid and inexpensive supplementary tool for udder health management through regular milk recording. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 181, p. 105079, 2020a.

SCHWARZ, D. *et al.* Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 5033–5044, 2011.

SCHWARZ, D. *et al.* Investigation of dairy cow performance in different udder health groups defined based on a combination of somatic cell count and differential somatic cell count. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 183, p. 105123, 2020b.

SCHWARZ, D. *et al.* Usefulness of the total and differential somatic cell count based udder health group concept for evaluating herd management practices and udder health in dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 218, 2023.

- SHOOK, G.E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 21., 1982, Pennsylvania. Proceedings. Madison: National Mastitis Council, 1982. p.150-166.
- SHOOK, G. E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. Proceedings of 21st Annual Meeting: NATIONAL MASTITIS COUNCIL. February 15-18, 1982, Arlington, VA., USA., pp: 150-166.
- SORDILLO, L. M.; SHAFFER-WEAVER, L.; DEROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, 1997.
- SOUZA, G. N. de *et al.* Dynamics of subclinical mastitis in holstein cows from brazilian dairy herds with low and high bulk tank somatic cell counts. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 2011. p. 201–202.
- STANEK, P.; ZOLKIEWSKI, P.; JANUŚ, E. A Review on Mastitis in Dairy Cows Research: Current Status and Future Perspectives. **Agriculture**, v. 14, n. 8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture14081292>
- STOCCO, G. *et al.* Differential somatic cell count as a novel indicator of milk quality in dairy cows. **Animals**, v. 10, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10050753>
- VALLOTO, A. A.; RIBAS NETO, P. G. **Avaliação e conformação da vaca leiteira**. Curitiba, PR, SENAR - PR, 2012.
- VEIGA, E. A. **Desenvolvimento de um sistema de bioimpedância elétrica baseado em FPGA**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Centro de Ciências Tecnológicas - Departamento de Engenharia Elétrica - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, Santa Catarina, 2013.
- VEIGA, E. A. *et al.* Evaluation of electrical bioimpedance spectroscopy for detection of milk adulteration-Preliminary results. In: ADSA ANNUAL MEETING, 2017, Pittersburgh, Pennsylvania: 2017.
- VEIGA, E. A.; BERTEMES-FILHO, P. Bioelectrical impedance analysis of bovine milk fat. In: **Journal of Physics: Conference Series**: Institute of Physics Publishing, 2012.
- WILKERSON, M. J. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 53–71, 2012.
- ZECCONI, A. *et al.* Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 460–465, 2019.
- ZECCONI, A. *et al.* Early Milk Total and Differential Cell Counts as a Diagnostic Tool to Improve Antimicrobial Therapy Protocols. **Animals**, v. 13, n. 7, p. 1143–1143, 2023.
- ZUFFO, G. R. **Espectroscopia por Bioimpedância Elétrica: análise em tempo real para a determinação da contagem de células somáticas no leite bovino**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Educação Superior do Oeste - Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, 2021.