

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

Utilização da Curva ROC para Classificação de Rebanhos Bovinos Leiteiros para a Presença de Patógenos Contagiosos da Mastite¹

Gabriel Raposo Frauches Vieira Sias², Naiara Aparecida de Oliveira³, Juliana França Monteiro de Mendonça⁴, Guilherme Nunes de Souza^{5,6}

¹O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig. Parte do projeto “Estruturação de um sistema de classificação de rebanhos bovinos leiteiros baseado em risco para a presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, liderado por Guilherme N. Souza

²Graduando em Medicina Veterinária – UFJF/Juiz de Fora. Bolsista da Fapemig. e-mail: gabrielfraux@gmail.com

³Profissional autônoma

⁴Doutoranda/Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – UFF/Niterói. e-mail: julianafmm@yahoo.com.br

⁵Pesquisador, Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora. e-mail: guilherme.souza@embrapa.br

⁶Orientador

Resumo: O trabalho objetivou utilizar a curva ROC para classificação dos rebanhos quanto à presença e ausência de *Streptococcus agalactiae* em uma população de rebanhos bovinos com base na relação entre isolamento microbiológico e dados de CCS dos rebanhos analisados. Foram coletadas amostras mensais de leite de tanque para análise de CCS de 43 rebanhos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais, entre junho de 2016 e novembro de 2017. Também foram coletadas 3 amostras de leite de tanque, de forma asséptica, para isolamento microbiológico de *Staphylococcus aureus* e *S. agalactiae*. A partir dos isolamentos microbiológicos identificou-se três diferentes perfis com relação à saúde da glândula mamária: não infectados, infectados apenas por *S. aureus*, e infectados por *S. aureus* e *S. agalactiae*. A área Curva ROC foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), representando 81,1%. Logo, o uso da CCS do rebanho em uma população com o perfil epidemiológico conhecido permitiu identificar rebanhos infectados por ambos patógenos. Para os rebanhos estudados, o valor entre 502.000 células/mL e 511.000 células/mL teve uma sensibilidade de 71% e especificidade de 75% para presença de *S. agalactiae*. A curva ROC permitiu classificar rebanhos com base em dados probabilísticos para a presença de *S. agalactiae*. Logo, um sistema de classificação baseado em dados probabilísticos, auxilia na tomada de decisão e na adoção de procedimentos para a erradicação de *S. agalactiae*.

Palavras-chave: mastite subclínica, monitoramento, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*

Use of the ROC Curve for the Classification of Dairy Herds for the Presence of Contagious Mastitis Pathogens

Abstract: The objective of this work was to use the ROC curve to classify the herds as to the possibility of presence and absence of *S. agalactiae* in a bovine herd population based on the relation of the microbiological isolation and the CCS data of the herds analyzed. Monthly samples of tank milk were collected for CCS analysis of 43 herds located in the Zona da Mata of Minas Gerais between June 2016 and November 2017. Data were transformed into log₁₀CCS for comparison of means. Three samples of tank milk were collected aseptically for microbiological isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae*. The results of the microbiological isolates identified three different profiles regarding the health of the mammary gland: uninfected, infected only by *S. aureus*, and infected by *S. aureus* and *S. agalactiae*. The ROC curve area was statistically significant ($p < 0.01$), representing 81.1%. Therefore, the use of CCS of the herd in a population with the known epidemiological profile allowed to identify herds infected by both pathogens. For the herds studied, the value between 502,000 cells/mL and 511,000 cells/mL had a sensitivity of 71% and specificity of 75% for the presence of *S. agalactiae*. The ROC curve allowed to classify herds based on probabilistic data for the presence of *S. agalactiae*. Therefore, a classification system based on probabilistic data assists decision making and the adoption of procedures for the eradication of *S. agalactiae*.

Keywords: monitoring, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, subclinical mastitis

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

INTRODUÇÃO

As decisões relativas ao controle da mastite baseiam-se no custo dos procedimentos adotados em casos clínicos e subclínicos (Halasa et al., 2007). Entre os agentes causadores de mastite, estão *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* que são frequentemente isolados nos rebanhos brasileiros. As inflamações das glândulas mamárias causadas por estes patógenos resultam em grandes variações no aumento da contagem de células somáticas (CCS) de vacas. Além disso, rebanhos com alta prevalência destes patógenos apresentam constantemente alta CCS (Harmon, 1994; Keefe, 2012), principalmente por serem patógenos que se caracterizam pela ocorrência de infecções crônicas. Rebanhos bovinos localizados em determinada região e/ou vinculados a associação de produtores, cooperativas ou indústrias podem realizar o controle e prevenção de patógenos contagiosos da mastite em nível de região por meio utilização da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A curva ROC é um gráfico da sensibilidade de um teste versus a taxa de falsos positivos (Dohoo et al., 2003). Ao estabelecer um ponto de corte ideal, a área sob a curva ROC permite avaliar a capacidade de um teste em distinguir animais infectados dos não infectados (Dohoo et al., 2003). Testes com desempenho satisfatório em discriminar rebanhos ou indivíduos infectados devem ter área sob a curva ROC superior a 0,7.

O objetivo do trabalho foi utilizar a curva ROC para classificar rebanhos quanto ao risco para a presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* com base na relação entre a sensibilidade e especificidade do isolamento microbiológico e dados de CCS de rebanhos bovinos leiteiros localizados na Zona da Mata de Minas Gerais e vinculados a uma cooperativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 43 rebanhos bovinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. No período de abril de 2014 a novembro de 2017, amostras de leite de tanque foram coletadas mensalmente para a realização da CCS, de acordo com os procedimentos descritos por Brito (2001). A CCS dos rebanhos foi realizada pelo método de citometria de fluxo em equipamento automatizado (Bentley – Somacount 300) de acordo com o IDF (2006).

No período de junho de 2016 a novembro de 2017, foram coletadas três amostras de leite de tanque de cada um dos 43 rebanhos selecionados para isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae*, totalizando 129 amostras. Os exames bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite de acordo com Brito et al. (1998).

As CCS dos rebanhos foram transformadas em log₁₀ para comparação das médias. A correlação da CCS ou log₁₀CCS com os resultados dos isolamentos dos patógenos contagiosos da mastite foi realizada por análise de variância (ANOVA) e, caso houvesse diferença, a identificação destas foi feita pelo teste de Bonferroni.

O limite de 500.000 células/mL foi definido com base no limite máximo permitido para CCS na nova legislação (Brasil, 2016). Para avaliar a associação entre as categorias de CCS e perfil de isolamento dos patógenos foi utilizado o teste do qui-quadrado.

A partir dos dados de prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae*, bem como da CCS de tanque, da sensibilidade e da especificidade do isolamento dos patógenos foi possível elaborar a curva ROC para a classificação dos rebanhos estudados como infectados ou não pelos patógenos pesquisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos exames microbiológicos permitiram classificar os rebanhos estudados em três perfis epidemiológicos distintos em relação ao padrão de infecção da glandula mamária (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de frequência de rebanhos bovinos localizados da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais de acordo com os resultados dos exames microbiológicos.

Resultados do exame microbiológico	N rebanhos	Positivos	Frequência (%)	IC 95%		Média de CCS (Células/mL)	Média Log ₁₀ CCS
				Inferior	Superior		
Sem isolamento	43	3	7,0 ^a	0,0	14,6	224.000 ^a	2,35 ^a

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

STAPH	43	5	11,6 ^a	2,0	21,2	447.000 ^a	2,65 ^a
STAPH+STRAG	43	35	81,4 ^b	69,8	93,0	794.000 ^b	2,90 ^b

^aLetras diferentes entre linhas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). *STAPH: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; N: número; IC 95%: intervalo de confiança 95%.

Nesse estudo, a área obtida sob a Curva ROC foi de 0,811 (81,1%) ($p < 0,01$) indicando que a utilização da CCS de tanque desta população de rebanhos, onde a prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* é conhecida, permite identificar rebanhos infectados por ambos patógenos com desempenho satisfatório (Figura 1).

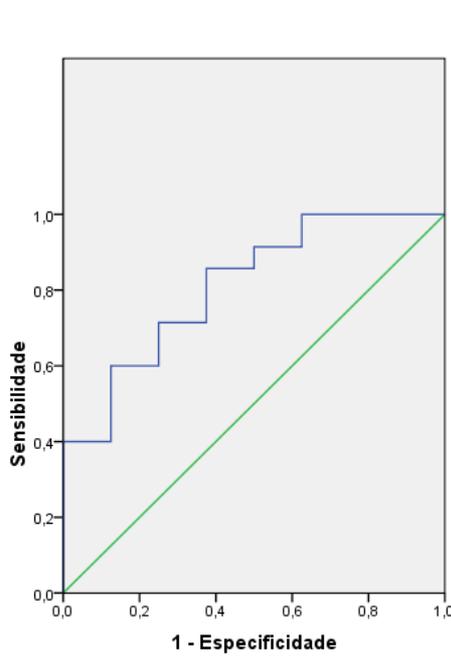
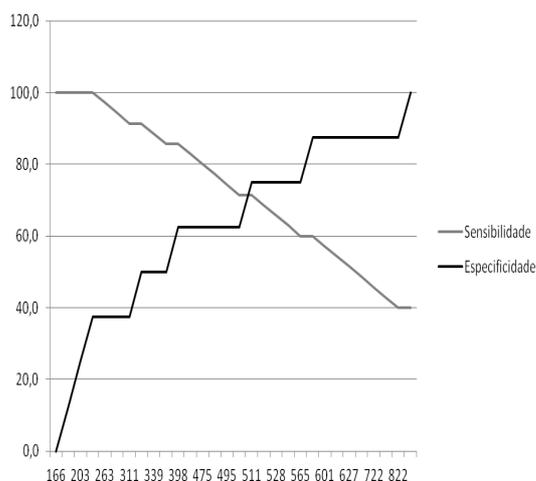


Figura 1. Área sob a curva (Curva ROC) para estimar a probabilidade de presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

O melhor ponto de corte para diferenciação dos rebanhos como infectados ou não por ambos os patógenos foi definido após a elaboração de um gráfico de linhas com variação da sensibilidade e da especificidade (Figura 2). Para a população estudada, o valor entre 502.000 células/mL e 511.000 células/mL gerou uma sensibilidade de aproximadamente 71% e especificidade de 75%. Portanto, aproximadamente 71% dos rebanhos com CCS igual ou superior a 511.000 células/mL seriam classificados corretamente para a presença de ambos os patógenos; enquanto 75% dos rebanhos com CCS inferior a 511.000 células/mL seriam corretamente classificados como rebanhos infectados somente por *S. aureus* ou sem a presença de ambos patógenos.



XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

Figura 21. Variação da sensibilidade e especificidade com base na contagem de células somáticas (CCS) do rebanho para presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*

CONCLUSÕES

Além disso, a utilização da curva ROC para dados de CCS de rebanhos associada ao estudo de prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* permitiu classificar satisfatoriamente rebanhos da população estudada com base em dados probabilísticos para a presença dos patógenos pesquisados. Os resultados encontrados no presente estudo não podem ser extrapolados para outra população de rebanhos devido a situação sanitária particular de cada uma. Entretanto, a metodologia pode ser usada em outras populações para estimar o risco da presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* com base em dados probabilísticos gerados a partir da CCS e estudos de prevalências para estes patógenos.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa, pelo apoio financeiro. Ao orientador, amigo e conselheiro Guilherme Nunes de Souza, pela oportunidade de realização desse sonho. À Juliana França Monteiro de Mendonça por todo aprendizado, paciência, e acima de tudo, por ser essa grande irmã.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 3 de maio de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 mai 2016.

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

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

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

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

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