

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-graduação em Zootecnia**



**Dissertação**

**Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas leiteiras**

**Ana Paula Schmidt**

**Pelotas, 2020**

**ANA PAULA SCHMIDT**

**Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas leiteiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Área do conhecimento: Produção Animal).

Orientador: Dr. Eduardo Schmidt  
Co-Orientador: Dr. Antônio Amaral Barbosa

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S349u Schmidt, Ana Paula

Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas leiteiras / Ana Paula Schmidt ; Eduardo Schmitt, orientador ; Antônio Amaral Barbosa, coorientador. — Pelotas, 2020.

41 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Doenças. 2. Vaca de leite. 3. Tecnologia. I. Schmitt, Eduardo, orient. II. Barbosa, Antônio Amaral, coorient. III. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Ana Paula Schmidt

**Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas leiteiras.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/02/20

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Eduardo Schmitt (Orientador)

Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

---

Dr. Antônio Amaral Barbosa (Co-orientador)

Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

---

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

---

Dr. Joao Alveiro Alvarado Rincón

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

---

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

*À minha amada filha Cecília.*

*Em um momento muito difícil vivido por  
mim, eu a tive acarinhando meu rosto.*

*À ela, pois eu jamais pensei em desistir.*

*Por ela, a meta de ser cada dia melhor.*

*Dedico*

## Agradecimentos

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

Aos colegas e professores do grupo NUPEEC, pela amizade, coleguismo e profissionalismo desde a graduação até a pós-graduação. Com vocês eu cresci pessoal e profissionalmente, aprendendo que precisamos sempre buscar conhecimento;

Ao pessoal da *chip-inside* COWMED, pelo suporte e troca de informações importantes para a pesquisa;

À granja 4 Irmãos, pela disponibilidade em compartilhar dados da fazenda para complementar o trabalho;

Ao orientador Eduardo Schmitt, por toda paciência e atenção necessária;

Ao Co-orientador Antônio Amaral Barbosa, por toda disponibilidade, preocupação e incansável orientação para o término desse ideal. Antônio, tenho muita admiração pelo profissional que és.

Aos meus amigos, de perto e de longe, por toda vibração positiva e palavras de incentivo quando meu mundo desabou;

A minha família, a quem sempre almejei ser orgulho. Minha gratidão por todas as vezes que precisei recorrer.

A Todos, muito obrigada!

## Resumo

SCHMIDT, Ana Paula. **Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas leiteiras.** 2020. 41f. Dissertação em Zootecnia - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A utilização dos sensores está cada vez mais sendo utilizado para detecção precoce de patologias relacionadas à pecuária de leite. Sua utilização como meio para detectar previamente a mastite e as informações por eles geradas sobre a saúde do úbere durante um período crítico ou doente, tornam-se cruciais para melhorar o bem-estar dos animais e atenuar os efeitos adversos em seu desempenho. Com isso, antever problemas futuros e instituir ações rápidas melhoram a qualidade e a expectativa de vida produtiva das vacas. O Objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de dados de perfil de ruminação obtidos por Sensores de coleira C-TECH (*chip-inside*), a fim de observar alterações prévias ou em associação à quadros de mastite clínica (MS) e subclínica (MC) que possam auxiliar no diagnóstico precoce da enfermidade. Foram extraídas informações do banco de dados de uma propriedade leiteira localizada no município de Rio Grande, RS, relativas a um período de 5 meses, sobre a taxa de ruminação (TR) média, valores máximos, mínimos e variabilidade da ruminação, tempo de sinalização do alerta pelo sensor e a sensibilidade do sistema de monitoramento, além da verificação do agente etiológico envolvido, nos casos de MC. Assim, foram incluídas no estudo 39 vacas mantidas em sistema de confinamento *Compost Barn*, com dieta ofertada duas vezes ao dia, livre acesso à água e média de produção do lote 38,4 litros de leite/dia. Os resultados de todas as médias da TR foram analisados no Programa SAS (2009), utilizando a análise de Mixed Model para o número de casos da doença e período (saudável e doente), considerando significativos valores de  $p < 0,05$  por meio do teste Tukey. Houve diminuição da TR média para o grupo MC no período doentio, com redução da TR em 14,85%. Os valores máximos de ruminação foram menores no período doente de cada grupo, além disso, as variações entre as máximas e mínimas ruminações foram menores nos animais com MS. A sensibilidade do sistema de monitoramento foi de 73,8%, e 73,3% para casos de MS e MC. Em média, os animais do grupo MS permaneceram doentes por 7,5 dias, em comparação a 6,5 no grupo MC, além de que em média os sensores indicaram alteração no padrão de ruminação para o grupo MS de 1,5 dias e o grupo MC, 2 dias. Os animais apresentaram mastite pelo agente etiológico do gênero *Streptococcus*, das espécies *uberis* e *agalactiae*. Nossos achados sugerem que a diminuição da TR média dos animais foi capaz de gerar alertas associados aos quadros de mastite, com potencial de utilização para o diagnóstico de mastite em vacas leiteiras.

**Palavras-chave:** doenças, vaca de leite, tecnologia

## Abstract

SCHMIDT, Ana Paula. **Use of the rumination profile by collar sensors for the diagnosis of mastitis in dairy cows.** 2020. 41f. Dissertation in Animal Science - Postgraduate Program in Animal Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

The use of sensors is increasingly being used for the early detection of diseases related to dairy farming. Their use as a means of detecting mastitis in advance and the information they generate about udder health during a critical or sick period, are crucial to improve the welfare of animals and mitigate adverse effects on their performance. Thus, anticipating future problems and instituting quick actions improve the quality and productive life expectancy of cows. The objective of this work was to evaluate the use of rumination profile data obtained by C-TECH collar sensors (chip-inside), in order to observe previous changes or in association with clinical (CM) and subclinical (SM) mastitis. that can assist in the early diagnosis of the disease. Information was extracted from the database of a property located in the city of Rio Grande, RS, for a period of 5 months, about the average rumination rate (RT), maximum, minimum values and variability of rumination, signaling time of the alert by the sensor and the sensitivity of the monitoring system, in addition to checking the etiological agent involved, in cases of CM. Thus, 39 cows kept in a Compost Barn confinement system were included in the study, with a diet offered twice a day, free access to water and an average production of 38.4 liters of milk / day. The results of all RT averages were run by the Statistical Analysis System Program (2009), using the Mixed Model analysis for the number of cases of the disease and period (healthy and sick), considering significant  $p < 0.05$  through the Tukey test. There was a decrease in the mean RT for the CM group in the sick period, with a reduction in the RT by 14.85%. The maximum values of rumination were lower in the sick period of each group, in addition, the variations between the maximum and minimum ruminations were lower in animals with SM. The sensitivity of the monitoring system was 73.8%, and 73.3% for cases of SM and CM. On average, the animals in the MS group remained sick for 7.5 days, compared to 6.5 in the MC group, in addition to the fact that on average the sensors indicated changes in the rumination pattern for the 1.5-day MS group and the MC group, 2 days. The animals presented mastitis by the etiological agent of the genus *Streptococcus*, of the *uberis* and *agalactiae* species. Our findings suggest that the decrease in the mean RT of the animals was able to generate alerts associated with mastitis, with potential use for the diagnosis of mastitis in dairy cows.

**Keywords:** diseases, milk cow, technology



## Sumário

1	Introdução.....	10
2.	Revisão De Literatura .....	12
2.1	Mastite Clínica.....	12
2.2	Mastite Subclínica .....	12
2.3	Agentes Etiológicos da Mastite.....	13
2.4	Prevalência da Mastite Clínica e Subclínica .....	14
2.5	Relevância Econômica da Mastite.....	15
2.6	Tecnologia de Monitoramento do Rebanho Leiteiro .....	16
3	Objetivos.....	20
3.1	Objetivo geral .....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	Artigo .....	21
5	Considerações Finais.....	35
6	Referências Bibliográficas.....	36

## 1 Introdução

A cadeia produtiva do leite é considerada uma das mais importantes do sistema agroindustrial brasileiro e está entre os produtos de maior importância do agronegócio nacional (ARAÚJO, 2019), além disso, é uma atividade de grande competitividade onde, o produtor é beneficiado pela maior produtividade e rendimento do produto (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). Dessa forma as propriedades leiteiras têm passado por processos de especialização, caracterizados pelo aumento do tamanho dos rebanhos e pela maior produtividade por vaca, tornando-se assim, a cada dia, mais eficientes (CARVALHO et al., 2015). Assim, à intensificação neste setor também aumenta o desafio metabólico de adaptação à lactação, a incidência de doenças que afetam o bem-estar, a produtividade e a qualidade do leite de vacas (HAILEMARIAM et al., 2014).

Um exemplo disso é a mastite que, de diferentes formas, prejudica todo sistema produtivo com expressivo impacto negativo na produção leiteira. Esta enfermidade é mencionada como a principal doença do gado leiteiro e apesar de intensas pesquisas e estratégias de manejo, a mastite bovina ainda permanece um imenso desafio (PETZER et al., 2017). Segundo Krewer et al. (2013), a mastite é amplamente difundida na indústria leiteira e sua prevalência na espécie bovina varia de 15,4 a 28,6%. Ainda, ela é responsável por afetar de 30 a 50% dos rebanhos leiteiros brasileiros, sendo fortemente associada com a redução na produção de leite, gastos com antibióticos, descarte do leite e desvalorização do animal (LEBLANC, 2010).

A mastite bovina é conceituada pela inflamação da glândula mamária e pode estar ou não acompanhada por quadro infeccioso, caracteriza-se por apresentar alterações patológicas no tecido glandular que causam transformações importantes nas propriedades físicas, químicas e organolépticas do leite (SAAB et al., 2014). Esta doença é determinada por inúmeras situações vinculadas ao manejo adotado na propriedade, podendo citar o ambiente e a presença de microrganismos como itens importantes nesse processo. No entanto, levando em conta seu caráter multifatorial, é importante o conhecimento dos fatores determinantes na ocorrência da doença para que haja a prevenção e o controle dentro das propriedades (CUNHA et al., 2015).

Esta enfermidade é resultante da introdução do microrganismo no canal do teto e seu curso clínico dependerá da capacidade do microrganismo de colonizar e multiplicar-se no úbere, do grau de virulência da cepa e da capacidade de resposta do hospedeiro, cuja multiplicação dos microrganismos e a produção de toxinas danificam o tecido secretor glandular causando traumatismo físico e irritação química (KULKARNI e KALIWAL 2013).

De acordo com as manifestações clínicas a mastite pode afetar os animais nas formas clínica e subclínica sendo, a Mastite clínica (MC) caracterizada por alterações visíveis no animal. Já a Mastite subclínica (MS) não é perceptível e o processo inflamatório necessita de testes de campo para seu diagnóstico (PANTOJA et al., 2009).

Por outro lado, a adoção de tecnologias de precisão, por sensores, utilizadas desde a década de 1980 em sistemas de produção nos Estados Unidos (RUTTEN et al., 2013) para identificação precoce e individualizada de animais doentes no rebanho, também vem se tornando rotina em algumas propriedades brasileiras, visto que esta inovação têm o objetivo de melhorar o gerenciamento dos rebanhos leiteiros e mensurar os indicadores produtivos, comportamentais e fisiológicos em benefício da saúde, produtividade e bem-estar dos animais (STEENEVELD; VERNOOIJ; HOGEVEEN, 2015).

Através dos sensores é possível mensurar o comportamento de ruminar dos animais que é compreendido pela ingestão prévia da dieta, regurgitação, remastigação e deglutição do bolo alimentar e o tempo gasto nesse processo (SCHIRMANN et al., 2016). Este parâmetro é considerado uma atividade fisiológica vital a estes animais e sua diminuição é interpretada *como um indicador precoce de doenças* (MUHLBACH, 2015).

Assim através de um diagnóstico precoce, preciso e direcionado é possível eliminar ou minimizar os efeitos das doenças, favorecer a recuperação da condição de saúde dos animais, reduzir as taxas de descarte e conseqüentemente reduzir as perdas econômicas na propriedade (TEIXEIRA et al., 2018). Neste sentido, este estudo objetivou avaliar dados da taxa de ruminação (TR) média de vacas leiteiras que fazem uso de coleiras de ruminação C-TECH (*chip-inside*) para diagnóstico preditivo de casos de mastite clínica e subclínica.

## **2. Revisão De Literatura**

### **2.1 Mastite Clínica**

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária e sua intensidade depende da interação entre fatores relacionados com o animal, o homem, o ambiente e a presença de agentes patogênicos que desencadeiam o processo inflamatório (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). Na forma clínica, o animal apresenta sinais evidentes da doença, tais como, dor, edema, endurecimento, sensibilidade ao tato e temperatura aumentada da glândula mamária. Além disso, há o aparecimento de pus, grumos e outras alterações nas características físicas do leite. O quadro pode apresentar outras manifestações como febre, queda na produção do leite e diminuição do consumo de alimentos (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). Casos mais graves da MC são caracterizados por perda de função em um ou mais quartos mamários e morte dos animais acometidos (HERTL et al., 2011).

O diagnóstico é feito primeiramente pelos primeiros sinais visíveis da inflamação como a dor e inchaço. No entanto o diagnóstico é confirmado com o auxílio da caneca de fundo preto (ou caneca telada) nos primeiros jatos de leite onde é possível visualizar a presença de coágulos (CASSOL, 2018). Uma vez confirmada a MC é importante adotar o controle higiênico-sanitário e, dependendo do agente causador da inflamação fazem-se necessárias intervenções rápidas logo nos primeiros sinais como, antibioticoterapia sistêmica e local, anti-inflamatórios, antitérmicos e terapia de suporte (CASSOL, 2018).

### **2.2 Mastite Subclínica**

Já mastite subclínica (MS), é caracterizada por ser silenciosa e não apresentar sinais clínicos evidentes na glândula mamária e no leite. Entretanto, nesta forma da afecção ocorre queda na produção, e a composição do produto sofre mudanças consideráveis nos teores de caseína, lactose, gordura e aumento na contagem de células somáticas (CCS) (LANGONI et al., 2017).

As CCS são células de defesa do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater um processo inflamatório instalado no úbere e, representada por leucócitos (80% a 98%) e uma pequena parte de células epiteliais oriundas da descamação dos alvéolos do úbere (2% a 20%)

(AIRES, 2010). No entanto, a CCS é mundialmente apontado como uma das formas de avaliação da saúde do úbere e qualidade do leite além de indicar de maneira quantitativa, o grau de infecção da glândula mamária (RANGEL et al., 2013).

Para o diagnóstico da MS há necessidade do uso de diagnósticos auxiliares de campo e laboratório, a exemplo do *Califórnia Mastitis Test* (CMT), condutividade elétrica do leite, *Wiscosin Mastitis Test* (WMT) e a CCS, sendo que o estado da infecção é o principal responsável pelas alterações deste último indicador (MACHADO et al., 2003). Animais diagnosticados com MS são tratados com antimastíticos intramamários e de uso sistêmico (CASSOL, 2018).

### 2.3 Agentes Etiológicos da Mastite

Saab et al. (2014) citam que os métodos utilizados na sala de ordenha para detecção da MC e MS são de extrema utilidade e ajudam no diagnóstico, mas ressaltam que são indiretos e não precisos. Propriedades tecnificadas fazem cultura microbiológica do leite de animais infectados para reconhecimento do agente etiológico presente no rebanho. Esta medida, auxilia a direcionar protocolos de tratamento adequado a cada caso de forma econômica e eficiente, com maior índice de recuperação dos animais além da tentativa de eliminar os patógenos causadores de zoonoses e toxinas que representem risco à saúde pública por causa de seu envolvimento em intoxicação alimentar (FORSYTHE, 2013).

Com base na origem do inóculo infeccioso, a mastite pode ser subdividida em contagiosa e ambiental. Em casos contagiosos os agentes vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha.

A espécie *Streptococcus* é uma das espécies encontradas com maior frequência no isolamento de amostras de leite de animais com MC e MS, na região Sul do Brasil, segundo Mesquita et al. (2012) (36,7%) e Saab et al. (2014) (31,6%). Porém outros microrganismos também são mencionados na literatura como causadores da mastite sendo eles, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma species* e *Corynebacterium bovis* (SILVA e ARAÚJO, 2008). Porém, Ramirez et al. (2014) cita que o *Streptococcus agalactiae* é o parasita obrigatório da glândula mamária dos ruminantes e por não conseguir sobreviver por longos períodos de tempo fora da glândula mamária sua transmissão ocorre fundamentalmente intra-ordenha.

Ainda considerado um importante patógeno causador de mastite pelo forte efeito na qualidade do leite, nos níveis de produção e contagem de células somáticas (KEEFE, 2012), o *Streptococcus agalactiae* é apontado como o microrganismo com maior prevalência nos rebanhos leiteiros (67,0%) (MESQUITA et al., 2018).

Nos casos dos agentes ambientais, estes vivem no meio onde os animais são criados e a infecção das glândulas ocorre no período entre as ordenhas (AIRES et al., 2006). Os agentes ambientais descritos com maior frequência segundo Picolli et al. (2014) são: *Streptococcus uberis* (16,8%), *Streptococcus dysgalactiae* (37,2%) mas podem ser encontrados outros com frequência variada, sendo: *Streptococcus bovis* (0,24%)(MOREIRA et al., 2016), *Enterococcus sp.*(3,33%) (MOREIRA et al.,2016), além disso, também incluem bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter* com 27,45% (MOREIRA et al., 2016).

Kulkarni e Kaliwal (2013) relatam que os animais acometidos com mastite causada por agentes ambientais possuem imunidade comprometida ou as condições higiênicas sanitárias não são favoráveis. Cita-se ainda que, casos de mastite causada por *Streptococcus uberis*, são comumente associados a alterações leves no leite e na inflamação do úbere (SCHUKKEN et al., 2011).

Em suma a identificação do agente etiológico causador da mastite favorece a escolha de um tratamento adequado, a fim de possibilitar o uso de estratégias eficazes na prevenção de novas ocorrências da doença no rebanho, com isso reduz resistência e gastos com a utilização de antibióticos (AIRES, 2010).

#### **2.4 Prevalência da Mastite Clínica e Subclínica**

Alguns estudos demonstram que o problema da mastite no rebanho é a prevalência silenciosa, ou seja, subclínica, determinando perdas de 78,8% por Kg de leite produzido na propriedade (LOPES et al., 2016). Regiões leiteiras tecnificadas incluindo numerosos rebanhos estimam que 20,1 a 40% de todas as vacas são acometidas por MC todos os anos (OLDE RIEKERINK et al., 2008).

De forma variada, em algumas regiões do Brasil a prevalência da MC demonstrou-se baixa, com frequências que variam na espécie bovina de 0,73% (LANGONI e TRONCARELLI, 2011) no Sudeste a 2,6% (KREWER et al., 2013) no Nordeste.

Todavia, Ziech et al. (2013) relataram que a MS está presente de 6,6 a 74,2% dos rebanhos brasileiros. Neste mesmo estudo, a nível regional, o estado do Rio Grande do Sul demonstrou prevalência da MS de 53% em 16 rebanhos estudados. Quando o estudo foi estratificado por quarto mamário SAAB et al. (2014) demonstraram que a prevalência da MS variou de 15,4 a 33%. Já Rodrigues et al. (2018) relata que no Brasil a prevalência da MS chega a 48,64% na espécie bovina.

Considerada uma das doenças mais dispendiosas das propriedades leiteiras, a mastite exige grande atenção do produtor, que deve monitorar de maneira sistemática diariamente o seu rebanho afim de reduzir perdas, custos e agregar qualidade ao leite (NÄÄS, 2011) e assim alcançar metas desejáveis com o menor impacto financeiro possível (PINHEIRO, 2009).

## **2.5 Relevância Econômica da Mastite**

O impacto econômico gerado pela mastite excede as porteiras de uma propriedade leiteira, em que apenas mudanças na composição do leite reduzem a sua qualidade, mas o “fator” antibióticos utilizados no tratamento da doença é o que gera a grande preocupação para a indústria, pois a presença de resíduo do fármaco no leite interfere no processamento dos produtos lácteos e representa um risco para a saúde pública (MARTINS et al., 2011). Além disso, casos de mastite nas propriedades costumam serem observados tardiamente, quando há queda na produção, gastos expressivos com o tratamento dos animais afetados, descarte do leite e dos animais pela perda dos tetos devida à cronicidade da doença (AIRES, 2010).

Diante desse cenário, alguns estudos foram conduzidos demonstrando o impacto econômico causado pela mastite nas propriedades leiteiras. Holanda e Madalena (2005) estimaram que os custos e perdas totais com a enfermidade foram equivalentes a US\$ 126,00 por vaca em lactação por ano. Para Demeu et al. (2011) as perdas econômicas em uma propriedade, decorridas pela mastite, variam de 41,32% em relação à renda bruta podendo com o descarte do leite atingir 64,3% do impacto total.

Lopes et al. (2012) avaliaram rebanhos constituídos por 100 vacas da raça holandesa em lactação que apresentaram frequência anual de mastite de 1%, apresentaram impacto econômico anual gerado pela enfermidade de R\$ 72.784,74. Todavia, Zanetti et al.(2013), encontraram perdas de R\$ 23.004,77 sendo, R\$

13.046,05 em decorrência do descarte de leite e R\$ 9.958,72 gastos com o tratamento, onerando 6,94% da renda proveniente da comercialização do leite.

Lopes et al. (2011) tomaram por referência uma vaca em lactação e ao observarem o impacto econômico anual da doença, a diminuição da produção e o menor valor pago pela indústria por Kg leite, encontraram respectivamente os valores de R\$ 1.333,90 a R\$ 2.145,89 e de R\$ 0,2146 a R\$ 0,4311/kg de leite produzido. Quando foram analisados os prejuízos econômicos de acordo com o diagnóstico subclínico e clínico da doença, alguns trabalhos relataram que cada caso de mastite não detectada precocemente, produz um prejuízo de cerca de 240 € /lactação (PINHEIRO, 2009). Outros trabalhos ressaltam que a perda econômica gerada pela queda na produção por vaca em lactação, ocasionada pela MS variou de R\$ 42,34 a R\$ 594,71 (LOPES et al., 2011), e casos anuais de MC com frequência de 1 e 15% as despesas variaram de R\$ 727,85 a R\$ 2.774,11 (LOPES et al., 2012).

Atualmente estudos demonstram prejuízos de aproximadamente US\$ 200/vaca/ano somente em função da ocorrência de mastite (CASSOL, 2018). Esta doença requer gastos representados principalmente por 70% de perda devido à redução na produção dos quartos com MS; 8% pela perda do leite descartado por alterações e/ou pela presença de resíduos após tratamento; 8% pelos gastos com tratamentos, honorários de veterinários, despesas medicamentosas; 14% por morte, descarte animal ou ainda pela desvalorização comercial do mesmo por apresentar quartos afuncionais ou atrofiados (CASSOL, 2018).

Ao que foi mencionado e pela relevância que a mastite causa, é possível diminuir os custos de produção quando se adotam medidas preventivas através de diagnóstico precoce, preciso e rápido de doenças nos rebanhos (KASIKÇI et al., 2012).

## **2.6 Tecnologia de Monitoramento do Rebanho Leiteiro**

A mudança no perfil do produtor rural, para um modelo empresarial de gestão da propriedade, trouxe para a pecuária leiteira a necessidade de um controle maior de todas as etapas do processo produtivo (REIS e LOPES, 2014). Assim sendo, um sistema informatizado e/ou automatizado permite monitorar e/ou controlar o funcionamento de um sistema físico de forma segura, rápida e automática (MACULAN e LOPES, 2016). Além disso, pode tornar a produção mais eficiente, com maior velocidade e eficácia na resposta frente a situações de adversidade.



Um sistema de automação é composto por sensores capazes de coletar e transferir as mais diversas informações para um controlador conectado a um processador (computador) o qual armazena os dados, processa, gera parâmetros de ação e os transforma em informações práticas aos usuários (SILVA, 2003). Estes equipamentos podem ser empregados em diversas etapas de um processo produtivo, que vão desde a identificação de animais até o monitoramento de sistemas de produção, da qualidade do leite e da saúde do úbere (PINHEIRO, 2009).

O monitoramento de saúde animal, visa automatizar o registro de ocorrências num dado sistema, bem como alertar o produtor em caso de situações excepcionais que exijam interferência humana. A literatura cita que existem alguns modelos de sistemas de monitoramento de saúde animal com os mais variados graus de complexidade e, que em algum momento pontos comuns os caracterizam no diagnóstico de doenças (REIS e LOPES, 2014).

Alguns modelos podem ser citados ao auxílio do monitoramento e gestão de saúde dos animais como: cochos eletrônicos desenvolvidos para gerar, de forma precisa, dados de consumo e de comportamento alimentar; o uso da termografia infravermelha que tem recebido muita atenção na detecção da mastite bovina (POLAT et al., 2010); os sistemas de ordenha robotizada baseados em sensores que utilizam a condutividade elétrica do leite para detectar vacas com esta enfermidade (SUN et al., 2010); além destes, sensores intraruminais; intravaginais; subcutâneos; pedômetros; brincos; buçais e os sensores acoplados em coleiras que mensuram tempo de ruminação (TR) cuja variações nesse parâmetro foram associados à detecção de mastite (SORIANI et al., 2012).

Diante da preocupação da mastite no setor leiteiro, torna-se importante o diagnóstico precoce dessa enfermidade a fim de identificar os animais em desafio no rebanho e tomar decisões alicerçadas no histórico do grupo ou do animal afetado. Nesse sentido os sistemas de sensores constituem instrumentos úteis para garantir na exploração leiteira a otimização do tempo do pessoal envolvido no manejo, maximização do potencial individual de cada animal e controle de doenças no plantel (CECIM, 2018).

Neste sentido alguns estudos foram conduzidos para detecção precoce de doenças. King e DeVries (2018) relataram que, em sistemas de ordenha automatizada, vacas com mastite apresentaram alteração na condutividade elétrica

do leite 12 dias antes do diagnóstico da doença. Já Soriani et al. (2012) utilizando este mesmo sistema relataram diminuição da TR média em vacas caracterizadas com doenças subclínicas ou distúrbios de saúde durante os primeiros 10 dias de lactação. Stangaferro et al. (2016) citam que os animais de seus estudos foram diagnosticados 3 dias antes da confirmação da MC.

Dentre as ferramentas existentes que monitoram o comportamento e a saúde dos animais já mencionados, a elaboração de coleiras para detecção de ruminação atividade e ócio tem ganhado mercado. Através de um sensor, acelerômetro triaxial e de um processador fixado nestas coleiras (CECIM, 2018), de forma geral, estes sistemas comparam, por exemplo, o perfil de ruminação, durante o dia, das vacas com a sua média nos dias anteriores e cada vez que existe um período de queda de ruminação, o sistema reconhece, emite alerta de “observação” para aquele animal e através disso é possível auxiliar no diagnóstico de doenças.

Para Cecim (2018) a ruminação tem relação com segurança e bem-estar da vaca e se dá normalmente com o animal deitado, em um aparente sinal de relaxamento e conforto. Porém, o TR pode ser afetado por algumas variáveis como o estresse, tamanho do animal, consumo e pela forma, composição e digestibilidade da dieta. Ainda, para Soriani et al. (2012), um dos fatores que reduz a TR é a inflamação. Por outro lado, o uso em pesquisa destes dispositivos revelou que as variações no tempo e no padrão diário de ruminação em um mesmo animal foram associados a uma série de eventos relacionados com a saúde, tais como proximidade do parto, mastite, metrite, cetose, deslocamento de abomaso e estresse térmico (CECIM, 2018).

É necessário que seja respeitada a individualidade de cada animal, assim sendo é difícil afirmar o padrão fisiológico de ruminação das vacas, mas alguns autores em seus estudos encontraram valores para TR de 600 min/d (BEAUCHEMIN,1991), 477 min/d (AIKMAN et al.,2008), 555 min/d (DEVRIES et al., 2009), 522 min/d (SORIANI et al., 2012) e White et al. (2017) encontrou TR média de 436 min / d, variando de 236 a 610 min / dia. Devido, a grande variabilidade individual é importante que cada animal doente seja comparado com ele mesmo quando saudável. No entanto, a queda da TR para detectar vacas com doenças clínica e subclínica pode fornecer informações adicionais e diferentes sobre a saúde geral das vacas, quando comparadas com aquelas fornecidas apenas por exame clínico (FITZPATRICK et al., 2013).

Sendo assim, analisando a problemática da Mastite nos rebanhos leiteiros, o uso da TR média fornecida através do monitoramento da saúde das vacas com sensores de coleira pode ser um meio eficiente para diagnóstico preditivo dessa enfermidade que, auxiliará reduzindo os efeitos negativos sobre a produtividade dos animais através de uma maior precocidade diagnóstica, proporcionada por esse modelo de ruminação (CARVALHO et al., 2015).

Nesta circunstância, buscou-se estudar a viabilidade do uso de dados de perfil de ruminação obtidos por sensores de coleira C-TECH (*chip-inside*) para diagnóstico de mastite em fêmeas bovinas de alta produção leiteira.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a taxa média de ruminação de bovinos leiteiros com mastite clínica e subclínica mediante a alertas de sensores de ruminação C-TECH (chip-inside) CowMed.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a taxa média de ruminação dos animais no período saudável e com diagnóstico de MC e MS de acordo com alertas de queda de ruminação;
- b) Verificar os valores máximos e mínimos de ruminação para os grupos MC e MS;
- c) Verificar a variação da taxa de ruminação média entre a máxima e mínima ruminação em cada grupo;
- d) Verificar qual foi o agente etiológico causador da mastite no rebanho experimental.

## 1 **4 Artigo**

### 2 **Uso do perfil de ruminação por sensores de coleira para diagnóstico de mastite em vacas** 3 **de leite**

### 4 **Use of the rumination profile by collar sensors for diagnosis of mastite in dairy cows**

5  
6 **Authors: Ana Paula Schmidt<sup>1,2\*</sup>, Laura Valadão Vieira<sup>1</sup>, Antônio Amaral Barbosa<sup>1</sup>,**  
7 **Eduardo Schmitt<sup>1,2</sup>**

### 8 9 **Abstract**

10 The purpose was to evaluate the use of C-TECH (Chip-inside) rumination monitoring  
11 collars and assess changes in the rumination time (RT) of animals affected with subclinical  
12 mastitis (SM) and clinical mastitis (CM). Thirty nine multiparous Holstein cows from a farm  
13 located in Rio Grande, RS/ Brazil with an average yield production of 38.4 liters / day. They  
14 were kept in a Compost Barn system, with free access to feed and water. The occurrence of 42  
15 cases of SM and 15 cases of CM were observed. When compared to the healthy period,  
16 animals with SM showed 5.33% drop in the rumination parameter. The system sensitivity for  
17 SM was 73.8%. For CM, there was a significant decrease in the average rumination time  
18 (RT), corresponding to 14.9%. The system sensitivity for CM was 73.3%. *Streptococcus*  
19 *agalactiae* and *S. uberis* were the etiologic agents causing CM. The maximum RT values  
20 were lower during the sick period of each group and the lowest variation was for the SM  
21 group. The findings suggest that the system was capable of generating alerts based on the  
22 decrease in the animals average RT related to mastitis.

23 **Keyword:** cow health, technology, udder

### 24 **1.Introduction**

25 Mastitis is a major health disorder in dairy cattle and it is defined as an inflammatory  
26 disease of the mammary gland attributed to a number of factors, including bacterial infection,  
27 which is considered the main cause (Langoni, Manzi, Lopes, 2018). Mastitis can be graded  
28 according to severity as subclinical mastitis (SM), characterized by raised levels of bacteria and

---

1 Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

2 Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

\*Autor para correspondência: ana\_psch@yahoo.com.br

29 somatic cells count (SCC) and clinical mastitis (CM), where clinical signs are detectable. CM is  
30 often classified as mild (abnormal milk), moderate (abnormal milk and changes in the udder),  
31 and severe (the cow develops systemic illness) depending on the bacteria's ability to colonize  
32 the mammary gland, magnitude and duration of the immune system response. The clinical signs  
33 include reduction in the milk yield, inappetence, pyrexia, dehydration, elevations in the heart  
34 and respiratory rates, and other signs of advanced endotoxaemia (Scott et al., 2011).

35 This disease has a high incidence as has been described by Olde Riekerink et al.(2008),  
36 which found in a study conducted in a highly intensified production system, that 20.1 to 40% of  
37 all cows are affected by CM every year. Furthermore, Langoni (2013a), estimated that for each  
38 case of clinical mastitis, occur 20 e 50 subclinical cases of the disease. Mastitis is responsible for  
39 great economic losses due to discarded milk, reduced production, lower milk quality, treatment  
40 costs, and premature disposal of animals (Demeu et al., 2016). A study conducted by Lopes et al,  
41 2012, with 100 Holstein cows found an annual approximated expenditure of R\$ 72.784,74 to R\$  
42 277.411,25 associated with mastitis.

43 Early diagnosis plays an important role in reducing the losses caused by mastitis (Reis  
44 and Lopes,2014) Among various tools to detect this disease, technologies such as collar-mounted  
45 accelerometers, pedometers, intra-ruminal and subcutaneous devices have become greatly  
46 effective ways to identify mastitis and other diseases in early stages, thus reducing the negative  
47 effects on animal health and, also, preventing producers financial costs (Reis and Lopes,2014).

48 Rumination sensors are able to assess changes in the rumination patterns of each cow,  
49 considering a rumination time (RT) of seven hours per day on average (Beauchemin, 2018).  
50 When RT is altered, the system generates an alert indicating that the animal is possibly facing a  
51 challenge, which could be the onset of a disease manifestation. Moreover, this type of

52 mechanism has the benefit of being non-invasive and does not interfere directly with the animal's  
53 natural behavior (Müller and Schrader, 2003). The C-Tech (Chip inside) collar sensors have an  
54 accelerometer that measures rumination, physical activity and bovine inactivity every hour. The  
55 system consists of the C-Reader and management software, which can generate a behavioral  
56 pattern for each animal in the herd and also an average pattern for the entire herd through  
57 behavioral data. Whenever the system detects an inconsistency in the animal behavioral pattern,  
58 it gives an alert to identify that the animal might be sick.

59 The objective of the present study was to evaluate the average rumination time (RT) of  
60 Holstein dairy cows during the healthy period and while affected by SM and CM through C-  
61 TECH (Chip-inside) rumination collars, as well as detect the sensitivity of the C-TECH  
62 rumination collars on detecting SM and CM.

## 63 **2. Materials and methods**

64 The experiment was approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of  
65 the Federal University of Pelotas (no. 22166). The study was conducted in a commercial  
66 property located in the south of Rio Grande do Sul, Brazil, between June and November 2018.

67 One hundred and twenty eight multiparous Holstein cows with an average milk yield of  
68 38,4 liters / day were assigned for this study. The animals were housed in a Compost Barn, had  
69 free access to water and were fed twice a day, in the morning and afternoon. The diet consisted  
70 of corn silage, pre-dried ryegrass, moist and concentrated grain, without nutritional changes  
71 during the whole study period. The system used to monitor the animal's RT was the C-TECH  
72 collars (Chip-Inside) and the CowMed® software, which captures data from the collar every  
73 hour. From the initial 128 animals, only 39 (30,46%) were suitable to enter the experiment, since  
74 they met the following criteria: (1) the animals should be monitored by the CowMed® system

75 platform; (2) their rumination pattern changes should be reported by the system; (3) they should  
76 be healthy for at least 15 days prior to the system alert; (4) SM diagnosis should be performed by  
77 the Veterinarian through the California Mastitis Test (CMT), besides the system alert; (5) CM  
78 diagnosis should be performed by the Veterinary through foremilk associated with the  
79 system alert. After diagnosis, the animals were enrolled into the Group SM or Group CM,  
80 according to the severity grade.

81         During the healthy period, the rumination rates were calculated as the mean of 15 days,  
82 while during the sick period, the rumination rates were calculated as the mean of the days under  
83 the system's alert. The animals were considered ill until their rumination patterns returned back  
84 to normal.

85         Further, the average values of maximum and minimum rumination and the variation  
86 occurring in each period were verified.

87         To enhance the results, it was considered for analysis purposes, the true positive cases,  
88 true negatives, false positives and false negatives, in order to affirm the efficiency of the  
89 monitoring system. Being:

90         I - True Positive (VP): Those animals that had an alert detected by the system and had  
91 their diagnosis confirmed by the Veterinarian through foremilk and CMT;

92         II - True Negative (VN): Those animals that did not have an alert and weren't diagnosed  
93 with any disease by the Veterinarian;

94         III - False Positive (FP): Those animals that had an alert and were diagnosed with another  
95 disease instead of mastitis;



96 IV - False Negative (FN): Those animals that did not have an alert and were diagnosed  
97 with any disease by the Veterinarian.

98 According to Côrtes (1993), the sensitivity period was calculated using the formula  
99 presented below.

$$100 \quad \text{True positives} / (\text{true positives} + \text{false negatives}) \times 100$$

101 Microbiological cultures of milk samples from the animals with CM were performed to  
102 identify the etiological agents that were causing mastitis. The on farm method was applied, in  
103 which a milk sample from the affected mammary gland quarter is sown on a tripartite  
104 Accumast® plate (Beast, New York). Each plate has three distinct and specific culture media for  
105 the growth of certain bacteria. The agents were identified on the farm according to the bacterial  
106 colony colour following the company instructions.

107 Once diagnosis had been confirmed by the veterinarian after the C-TECH collars alert,  
108 milk was collected in a sterile bottle and, subsequently, a sample was sown on the plates using a  
109 swab and these were stored in an incubator at 37°C. After the first 16 hours of sowing, colonies  
110 were identified according to the culture medium, being they: substrate 1 specific for the growth  
111 of gram-negative bacteria (*Klebsiella spp.*, *E.coli* and *Pseudomonas*); substrate 2 (*Streptococcus*  
112 *spp.*, *Lactococcus spp.* and *Enterococcus. Spp*); substrate 3 (*Staphylococcus aureus* and  
113 *Staphylococcus spp*).

114 The results of all average RT were run by the Statistical Analysis System Program (SAS,  
115 SAS Institute Inc., Cary, EUA 2009), using the Mixed Model analysis for the number of cases of  
116 the disease and period (healthy and sick), considering significant  $p < 0,05$  using the Tukey test.

### 117 3. Results

118 During the study period, 57 cases of mastitis were observed, in which 42 were SM and 15 were  
 119 CM. The C-TECH collar detection sensitivity was 73,8% (31 cases) for SM and 73,3% for CM  
 120 (11 cases).The animals average RT for both groups in each period are described in Tab 1.

121 Table 1.

122 Average Rumination Rates  $\pm$  Standard Error, for the Subclinical Mastitis (SM) and Clinical Mastitis  
 123 (CM) groups in each period during the months from July to November 2018.

Group	Period		P-value
	Healthy	Sick	
SM	581.50 $\pm$ 11.88	550.48 $\pm$ 11.88	0.068
CM	587.41 $\pm$ 16.69	500.30 $\pm$ 16.69	0.001

124  
 125 It was found that the animals average RT in the SM group tended to be lower during the  
 126 sick period (550,48  $\pm$  11,873min / d) (p = 0,068) compared to the healthy period (581,50  $\pm$   
 127 11,873min / d) representing a 5,33% reduction on the evaluated parameter when the periods were  
 128 compared. The average time in which the animals in the SM group remained ill throughout the  
 129 study period was 7,5 days compared to 6,5 in the CM group.

130 There was a decrease in the cows average RT with CM (p = 0,0014) which presented  
 131 rates of 500,30  $\pm$  16,679 min / d when symptomatology was present, and 587,41  $\pm$  16,679 min /  
 132 d during the healthy period, showing a decrease of 14,85% when periods were compared. The  
 133 maximum and minimum values of rumination and the average variation of this parameter were  
 134 verified in each group and period studied, being shown in the tab 2.

135 Table 2.

136 Values found of maximum and minimum rumination and variation  $\pm$  Standard Error, of the Subclinical  
 137 Mastitis (SM) and Clinical Mastitis (CM) groups of each period during the months from July to  
 138 November 2018.

Group	Rumination Rate (min/d)	Períod		P-value
		Healthy	Sick	
SM	Maximum	698.97±11.08	648.11±11.38	0.002
	Minimum	431.08±21.45	444.00±22.02	0.675
	Variation	267.90±19.70	198.74±19.95	0.015
CM	Maximum	694,18±19,54	611,11±21,60	0,010
	Minimum	452,73±20,20	397,78±22,33	0,084
	Variation	241,45±28,38	213,33±31,37	0,514

139

140 There was a decrease in the maximum rumination time (RT) in the SM ( $p = 0,002$ ) and  
 141 CM ( $p = 0,010$ ) groups during the period when the animals were sick. Regarding the minimum  
 142 RT, the cows in the CM group tended to have a lower RT ( $p = 0,08$ ) compared to healthy cows.  
 143 The average variation of RT between the maximum and minimum values, showed a difference  
 144 for the SM group ( $p = 0,015$ ) with lower fluctuations of the parameter during the ill period.

145 In addition, *Streptococcus agalactiae* and *S. uberis* were the etiologic agents causing CM,  
 146 whereas in the SM cases the agent verification test was not performed according to the farm  
 147 protocol.

#### 148 4. Discussion

149 Researchers approach that the maximum physiological time of rumination is about 10 to  
 150 12 h / d, in cattle fed high fiber diets (De Boever et al., 1990), but the majority of dairy cows fed  
 151 mixed diets ruminate by less time (Watt et al., 2015). Therefore, lactating dairy cows spend  
 152 around 7 hours a day on rumination (420 minutes) (Beuchemin,2018). Studies have shown an  
 153 association between a decreased RT and clinical and subclinical health disorders (Gáspárdy et  
 154 al., 2014). Likewise, our study has shown that during the ill period the RT was reduced by 5,33%

155 for SM and by 14,85% for CM, which could be related to the challenge faced by the animals  
156 with mastitis.

157         Although only a handful of studies were performed on that subject, our findings are  
158 similar to those of White et al. (2017), who found an average RT value of 436 min / d, ranging  
159 from 236 to 610 min / d in a dairy herd of 179 animals. When comparing a group of healthy  
160 cows with a group of ill cows, King et al. (2018) noticed a wide variation in RT among cows and  
161 that RT started to differ from the normal pattern up to two weeks before the mastitis diagnosis.  
162 Correspondingly, Kaufman et al. (2016) and Schirmann et al. (2016), noticed lower RT in sick  
163 animals, when comparing cows that presented some type of health disorder with healthy cows.  
164 Thus, when exploring behavioral data before the onset of health problems, King et al. (2017)  
165 found that the RT parameter helped to identify diseases before the animals were affected. It was  
166 detected in our study, a 31 and 87 min / d reduction in the average RT associated with the  
167 presence of SM and CM, respectively. These results exceed the observations of Stangaferro et al.  
168 (2016) who found a 10,4 min / d decrease in RT of dairy cattle with mastitis, similar to Liboreiro  
169 et al. (2015) who found a 80 min / d reduction in RT when they associated this parameter with  
170 the onset of subclinical disease.

171         Some researchers have detected a 397 min / d lower RT in cows diagnosed with CM  
172 compared to healthy cows (Stangaferro et al., 2016). Our results corroborate the study  
173 mentioned, where the same group presented the same values, suggesting that the use of alerts  
174 generated based on this indicator can be used as a tool to diagnose both SM and CM.  
175 Furthermore, some studies have evaluated average RT in cows with induced clinical mastitis or  
176 challenged with membrane lipopolysaccharide (LPS) (Fitzpatrick et al., 2013) and have shown  
177 reductions in RT varying 2 to 7 h / d before diagnosis or disease induction (Paudyal et al., 2017).

178 It was observed that the maximum and minimum RT in this study were decreasing at the  
179 diagnosis moment. In addition, the existing average variability was lower in cases affected by  
180 SM. Minor variations in this group may explain that these animals have more chances to get their  
181 rumination patterns back to normal and overcome the discomfort caused by a subclinical disease.

182 *Streptococcus agalactiae* is one of the main bacteria that causes mastitis in contagious  
183 form. These microorganisms survive inside the host and may be present in the body of the animal  
184 (Rodrigues et al., 2018). This pathogen is mandatory in the bovine mammary gland and due to its  
185 characteristics, in most cases have highly contagious behavior (Keefe, 2012). *Streptococcus*  
186 *uberis* is present in several sources of the farm environment, such as contaminated water, feces,  
187 soil, organic materials used as bedding, the animal itself, the milking equipment and humans  
188 (Langoni, 2017). During the bacterial infection, many cytokines are released to modulate the  
189 inflammatory and immune responses. The Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) cytokines can be used  
190 as biomarkers for an inflammatory condition (Bingham, 2002). Although it has a plasma half-life  
191 of only 20 minutes, it is capable of causing important metabolic and hemodynamic changes such  
192 as activating other cytokines included the Interleukin-6 (IL-6), an important mediator in the  
193 release of acute phase proteins by hepatocytes during painful stimuli (Raeburn et al., 2002).

194 Therefore, a possible cause of the reduction in the animals average RT might be due to  
195 the large release of those inflammatory mediators, which regulate the release of inflammatory  
196 cells on the injured tissue mediated by the hypothalamus, possibly activating the satiety center  
197 (Kunkel and Butcher, 2002). Hence, it can reduce the animal feed intake and affect the RT.

198 Technologies capable of detecting rumination patterns as well as other behavior aspects  
199 are being increasingly incorporated into production systems and they can become part of the  
200 routine of dairy farms. Lower RT is a promising indicator to provide information on health risks

201 and to monitor the metabolic conditions associated with diseases (Soriani et al., 2012). These  
202 animal monitoring technologies allow the identification of potential problems such as mastitis,  
203 which is still one of the most concerning diseases for dairy farmers. The vast information  
204 generated by the sensors is a precious resource that can potentially be used to reduce production  
205 losses, adopting different strategies, one being the establishment of treatments that reduce the  
206 disease negative effects on the animal's productive potential (Petzer et al, 2017).

## 207 **5. Conclusion**

208 The average RT of multiparous dairy cows proved to be efficient in the predictive  
209 diagnosis of MS and CM up to two days before the disease onset. In addition, its variability  
210 demonstrated that animals with subclinical cases had lower fluctuations when sick. In addition,  
211 the animals presented mastitis caused by *Streptococcus agalactiae* and *S. uberis*.

## 212 **Acknowledgements**

213 The authors are grateful to the Post Graduation Program in Zootechnics from the Federal  
214 University of Pelotas (PPGZ - UFPel, Pelotas, Brazil) and the Coordination for the Improvement  
215 of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) for the financial support. A special  
216 thanks to the commercial property Granjas 4 Irmãos (Rio Grande, Brazil) for the availability of  
217 the animals and the company CowMed® (chipinside) for the partnership formed

## 218 **References**

219 Beauchemin K.A., 2018. *Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy*  
220 *cows. Journal of Dairy Science. Volume 101, pp. 4762-4784. DOI:https://doi.org/10.3168/jds.2017-*  
221 *13706 .*

- 222 Bingham, C.O. 2002. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone  
223 degradation and inflammation. *J Reum.* 29 supl 65:3-9.
- 224 Côrtes, J.A. 1993. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais.* São Paulo. Livraria Varela.  
225 P.133-138.
- 226 De Boever, J.L., Andries J.I., De Brabander, D.L., Cottyn, B.G., Buysse, F.X. 1990. Atividade  
227 mastigatória em ruminantes como uma medida de sua estrutura física - Uma revisão dos fatores que o  
228 afetam. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27, pp. 281 – 291. DOI: 10.1016 / 0377-8401 (90) 90143-V.
- 229 Demeu, F.A et al, 2016. Efeito da produtividade diária de leite no impacto econômico da mastite em  
230 rebanhos bovinos. *Boletim de Indústria Animal*, v.73, n.1, p.53-61. DOI:  
231 <http://dx.doi.org/10.17523/bia.v73n1p53>.
- 232 Fitzpatrick, C.E., Chapinal, N., Petersson-Wolfe, C.S., DeVries, T.J., Kelton, D.F., Duffield, T.F.,  
233 Leslie, K.E. 2013. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in  
234 dairy cows with endotoxin-induced clinical mastites. *J. Dairy Sci.*, 96, pp. 2847-2856. DOI:  
235 10.3168/jds.2012-5855.
- 236 Gáspárdy, A., Efrat, G., Bajcsy, A.C., Fekete, S.G. 2014. Electronic monitoring of rumination activity as  
237 an indicator of health status and production traits in high-yielding dairy cows. *Acta Vet. Hung.* 62:452–  
238 462. DOI: 10.1556/AVet.2014.026.
- 239 Kaufman, E.I., Leblanc, S.J.B., McBride, W.T., DeVries, T. J. 2016. Association of rumination time with  
240 subclinical ketosis in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:5604–5618. DOI:  
241 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10509>.
- 242 Keefe, G. P. 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for  
243 management of mastitis. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 28:203-2016.  
244 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>.

- 245 King, M.T.M., Leblanc, S.J., Pajor, E.A et al. 2018. Behavior and productivity of cows milked in  
246 automated systems before diagnosis of health disorders in early lactation. *J. Dairy Sci.* 101:4343–4356.  
247 DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13686>.
- 248 King, M.T.M., Dancy, K.M., LeBlanc, S.J., Pajor, E.A., DeVries, T.J. 2017. Deviations in behavior and  
249 productivity data before diagnosis of health disorders in cows milked with an automated system. *J. Dairy*  
250 *Sci.*, 100 , pp. 8358-8371. DOI: 10.3168/jds.2017-12723.
- 251 Kunkel, E.J., Butcher, E.C. 2002. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes.  
252 *Immunity* 16:1-4.
- 253 Langoni, H. 2013a. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de  
254 mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.5, p.620-626.
- 255 Langoni, H. et al. 2017. Research of *Klebsiella pneumoniae* in dairy herds. *Pesquisa Veterinária*  
256 *Brasileira*, v. 35, n. 1, p. 9–12. DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100011.
- 257 Liboreiro, D.N., Machado, K.S., Silva, P.R et al. 2015. Characterization of peripartum rumination and  
258 activity of cows diagnosed with metabolic and uterine diseases. *J. Dairy Sci.* 98:6812–6827. DOI:  
259 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8947>.
- 260 Lopes, B.C., Manzi, M.P., Langoni, H. 2018. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da  
261 classe Mollicutes. *Vet. e Zootec.* 25(2): 173-179. DOI: Müller, R., Schrader, L. A. 2003. New method to  
262 measure behavioural activity levels in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 83:247–258. DOI:  
263 10.1016/S0168-1591(03)00141-2.
- 264 Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F., Scholl, D.T. 2008. Incidence rate of clinical  
265 mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 91, 1366-1377. DOI:10.3168/jds.2007-0757.



- 266 Paudyal, S., Maunsell, F. P., Richeson, J.T et al. 2017. Rumination time and monitoring of health  
267 disorders during early lactation. *Animal* 12:1484–1492. 2017. DOI: 10.1017/S1751731117002932.
- 268 Petzer, I.M., Etter, E.M.C., Donkinc, E.F et al 2017. Epidemiological and partial budget analysis for  
269 treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* intramammary infections considering microbiological and  
270 cytological scenarios. *Preventive Veterinary Medicine*. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.](http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.10.005)  
271 2017.10.005.
- 272 Raeburn, C.D., Sheppard, F., Barsness, K.A et al. 2002. Cytokines for surgeons. *Am J Surg*. 183:268-  
273 273. DOI: S0002-9610(02)00781-X.
- 274 Reis, E. M. B., Lopes, M. A. 2014. Métodos automatizados de diagnóstico de mastite em vacas leiteiras:  
275 uma revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 17, n. 3, p. 199-208. DOI: [https://doi](https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i3.2014.4945)  
276 [.org/10.25110/arqvet.v17i3.2014.4945](https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i3.2014.4945).
- 277 Rodrigues, T.P., Coelho, M. G., Santos, A.P et al. 2018. Mastite Bovina – Influência na Produção,  
278 Composição e Rendimento Industrial do Leite e Derivados. *Arquivos de Pesquisa Animal*, v.1, n.1, pp.14  
279 –36.
- 280 Schirmann, K., Weary, D.M., Heuwieser, W.N. et al. 2016. Short communication: Rumination and  
281 feeding behaviors differ between healthy and sick dairy cows during the transition period. *J. Dairy Sci.*  
282 99:9917– 9924. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10548>.
- 283 Scott, P.R., Penny, C.D., Macrae, A.I. 2011. *Cattle Medicine*. Manson Publishing Ltd, p. 216-218.
- 284 Soriani, N., Trevisi, E., Calamari, L. 2102. Relationships between rumination time, metabolic conditions,  
285 and health status in dairy cows during the transition period. *J. Anim. Sci.*90:4544–4554  
286 doi:10.2527/jas2012-5064. DOI:10.2527/jas2012-5064.

- 287 Stangaferro, M.L., Wijma, R., Caixeta, L.S. et al. 2106. Use of rumination and activity monitoring for the  
288 identification of dairy cows with health disorders: Part II. Mastitis. *J. Dairy Sci.* 99:7411–7421. DOI:  
289 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11352>.
- 290 Watt, L.J., Clark, C.E.F., Krebs, G.L., Petzel, C.E., Nielsen, S., Utsumi, S.A. 2015.  
291 Differential rumination, intake, and enteric methane production of dairy cows in a pasture-based  
292 automatic milking system. *J. Dairy Sci.*, 98. pp. 7248-7263. DOI: 10.3168/jds.2015-9463.
- 293 White, R.R., Hall, M.B., Firkins, J.L., Kononoff, P.J. 2017. Physically adjusted neutral detergent  
294 fiber system for lactating dairy cow rations. I: Deriving equations that identify factors that  
295 influence effectiveness of fiber. *J. Dairy Sci.*, 100, pp. 9551-9568. DOI: 10.3168/jds.2017-12766.

## 5 Considerações Finais

O uso de sensores como meio para detectar previamente a mastite e as informações por eles geradas sobre a saúde do úbere durante um período de desafio para as vacas, tornam-se importantes para melhorar o bem-estar dos animais e atenuar os efeitos adversos em seu desempenho. Além disso, o uso das tecnologias de precisão são úteis para obtenção de dados de forma a não interferir diretamente no comportamento natural dos animais. Para isso a avaliação individual e sistemática dos animais é importante para que se possa criar padrões de comportamento e com isso detectar facilmente as alterações na saúde das vacas.

Um grande desafio para produtores de leite é o controle da mastite, doença infecciosa que traz perdas econômicas significativas para o setor leiteiro, e a ausência do diagnóstico precoce é um fator limitante e decisivo para o sucesso do tratamento e recuperação dos animais. Com isso, prever problemas futuros e estabelecer ação rápida e precisa com tratamentos a cerca de cada caso, podem ser medidas importantes e valiosas para os gestores das propriedades leiteiras.

Com este trabalho foi possível verificar que o comportamento da TR média de vacas leiteiras multíparas de alta produção da propriedade estudada, pareceu ser eficiente no diagnóstico preditivo de MS e MC. Além disso, os sensores de coleira C-TECH *chip inside* da Cowmed demonstraram ser ferramentas úteis e com um alto potencial para diagnóstico preditivo em até dois dias antes da ocorrência da doença.

## 6 Referências Bibliográficas

AIRES, Túlia Andreia Cordeiro Pinto. *Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho*. **Dissertação Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**. 2010. 87 f – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. 2010.

AIKMAN, P. C.; REYNOLDS, C.K.; Beever, D.E. Diet digestibility, rate of passage, and eating and rumination behavior of Jersey and Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 91:1103–1114. 2008.

ARAÚJO, Laryssa Nany Medeiros. Caracterização do sistema de produção de leite em propriedades de agricultura familiar da região de luziânia-go. 18p. 2019. Disponível em <[https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/198/1/Larissa\\_Ara%c3%bajo\\_0001388.pdf](https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/198/1/Larissa_Ara%c3%bajo_0001388.pdf)> acesso em: 15 jan. 2020.

BEAUCHEMIN, K.A. Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 7:439–462. 1991.

BRITO, L.G.; SALMAN, A.K.D.; GONÇALES, M. A. R.; FIGUEIRÓ, M. R. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007.40 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 116). 2007.

CARVALHO, B.C; PIRES, M.F.A.; ARBEX, W.; SANTOS,G.B. Uso de tecnologias de precisão na reprodução de bovinos leiteiros. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, nº 79, 2015.

CASSOL, Daniela Miyasaka. **O presente Rural. Portal Palotina**. 2018. Disponível em <<http://portalpalotina.com.br/artigo/especialista-aponta-maneira-correta-de-diagnostico-e-tratamento-da-mastite-C-18853>> Acesso em 05/12/19.

CECIM, M. Monitoramento Remoto de Saúde da Vaca em Transição. In: V Simpósio da Vaca Leiteira, 2018, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: **Editora UFRGS**, p.86-113, 2018.

CUNHA,A.F.;BRAGANÇA,L.J.;QUINTÃO,L.C. et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite subclínica em rebanhos leiteiros de Viçosa -MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, 9(2):160-166. 2015.

DEMEU, F. A.; DA ROCHA, C. M. B. M.; DA COSTA, G. M. et al. Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Revista Ceres**, v. 62, n. 2, p. 167-174, 2015.

DEVRIES, T.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; DOHME, F.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. **J. Dairy Sci.** 92:5067–5078. 2009.

FITZPATRICK, C.E.; CHAPINA, N.L.; PETERSSON-WOLFE, C.T. et al. Identification of predictive biomarkers of disease state in transition dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97:2680–2693, 2013.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. **2ª ed. Artmed**, Nebraska. 602p. 2013.

HAILEMARIAM, D.; MANDAL R.; SALEEM, F. et al. Identification of predictive biomarkers of disease state in transition dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97:2680–2693, 2014.

HERTL, J. A.; SCHUKKEN, Y.; BAR, D. et al. The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on mortality and culling in Holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.** 94:4863–4877. 2012.

HOLANDA, E.V.; MADALENA, J. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – Minas Gerais, Brasil. **Archivos latino americanos de producción animal**, Petrolina, v. 13, n. 2, p. 63-69, 2005.

KAŞIKÇI, G. et al. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Science**, Istanbul, v. 36, n. 1, p. 49-55, 2012.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Vet. Clin. Food Anim.** 28:203-216. 2012.

KING, M. T. M.; DEVRIES, T. J. Graduate Student Literature Review: Detecting health disorders using data from automatic milking systems and associated Technologies. **J. Dairy Sci.** 101:1–10. 2018.

KREWER C.C., LACERDA I.P.S., AMANSO E.S. et al. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.** 33:601-606. 2013.

KULKARNI A.G.; KALIWAL, B. Bovine mastitis: a review. Int. **J. Recent Sci. Res.** 4:543-548. 2013.

LANGONI, H; TRONCARELLI, M. The complex etiology on bovine mastitis and the importance of the microbiological diagnostic: animal hygiene and sustainable livestock production. Proc. XVth International **Congress of the International Society for Animal Hygiene**, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Vol.3. Tribun EU, p.1357-1358. 2011.

LANGONI, H. et al. Research of *Klebsiella pneumoniae* in dairy herds. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 1, p. 9–12, 2017.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **J. Reprod. Dev.** 56:S29–35, 2010.

LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, Lavras, v. 79, n. 4, p. 64-79, 2012.

LOPES, M.A., DEMEU F.A., ABREU, L.R. et al. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arqs Inst. Biológico**, São Paulo 78(4):493-499. 2011.

LOPES, M. A. et al. Sistema computacional: Avaliação do impacto econômico da mastite. **PUBVET**, v.10, n.4, p.312-320. 2016.

MACULAN, R.; LOPES, M.A. ORDENHA ROBOTIZADA DE VACAS LEITEIRAS: UMA REVISÃO. **B. Industr. Anim.** Nova Odessa,v.73, n.1, p.80-87, 2016.

MACHADO, C. A.; DEMETRIO, P. F.; BORGES, C. G. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF. v. 38, n. 12, p. 1451-1457, 2003.

MARTINS, P. F.; ANDRADE, H. V. Identificação de resíduos de antibióticos na recepção de leite cru prébeneficiado como perigo potencial para implantação do

plano APPCC em laticínios. **FAZU em Revista**, Uberaba, v. 4, n. 8, p. 108-114, 2011.

MESQUITA A.J.; JARDIM, E.A.G.D.V.; KIPNIS, A.P.J. Association of TLR4 polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian holsteins. **Braz. J. Microbiol.** 43:692-697. 2012.

MESQUITA, A. A., ROCHA, C.M.B.M.;BRUHN, F.R.P.et al. Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 39(5):308-316, 2018.

MOREIRA, A. P. F. M.; ARAUJO, T. M. L. O.; LOPES, T. A. F. et al. Levantamento microbiológico de amostras de leite provenientes de fazendas do sul sudoeste do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 83-83, 21 dez. 2016.

MÜHLBACH, Paulo. R. F. Ruminação, a mais importante manifestação da vaca leiteira. Milkpoint .Disponível em < <https://www.milkpoint.pt/seccao-tecnica/gestao-sistemas-producao/ruminacao-a-mais-importante-manifestacao-de-bemestar-da-vaca-leiteira-95848n.aspx?r=1995520593> > 2015. Acesso em 10/09/19.

NÄÄS, I. A. Uso de técnicas de precisão na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Dourados, v.40, n.1(supl. especial), p.358-364, 2011.

OLDE RIEKERINK, R. G. M. et al. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1366–1377, 2008.

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 subsequent lactation. **J.Dairy Sci.** 92:139:148. 2009.

PETZER, I.M.; ETTER, E.M.C.; DONKINC, E.F. et al. Epidemiological and partial budget analysis for treatment of subclinical Staphylococcus aureus intramammary infections considering microbiological and cytological scenarios. **Preventive Veterinary Medicine**, 2017.

PICOLI T.; ZANI, J.L.; BANDEIRA, F.S. et al. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. **Semina: Ciências Agrárias** 35(4):2471-2480. 2014.

PINHEIRO, C.; PINHEIRO, A. Inovação e tecnologia na formação agrícola. Lisboa. **Manual Técnico**. 150 p. 2009.

POLAT, B.; COLAK, A.; CENGIZ, M. et al. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3525-3532, 2010.

RAMÍREZ N.F.; KEEFE, G.; DOHOO, I. et al. Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. **J. Dairy Sci.** 97:4141-4150. 2014.

RANGEL, A.H.N. et al. Avaliação da qualidade do leite cru com base na contagem de células somáticas em rebanhos bovinos comerciais no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 1, p. 40-45, 2013.

REIS, E.M.B.; LOPES, M.A. Métodos automatizados de diagnóstico de mastite em vacas leiteiras: uma revisão. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 199-208, jul./set. 2014.

RODRIGUES, T.P; COELHO, M. G; SANTOS, A.P. et al. Mastite Bovina – Influência na Produção, Composição e Rendimento Industrial do Leite e Derivados. **Arquivos de Pesquisa Animal**, v.1, n.1, p.14 - 36, 2018.

RUTTEN, C.J.;VELTHUIS, A.G.J.,STEENEVELD, W., et al. Sensors to support health management on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.96, p.1928-52, 2013.

SAAB, A.B.; ZAMPROGNA, T.O.; LUCAS, T.M. et al. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. **Semina: Ciênc. Agrarias** 35:835-843. 2014.

SCHIRMANN, K.; WEARY, D. M.; HEUWIESER, W. et al. Short communication: Rumination and feeding behaviors differ between healthy and sick dairy cows during the transition period. **J. Dairy Sci.** 99:1–8 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10548>. 2016.

SCHUKKEN, Y. H.; GÜNTHER J.; FITZPATRICK, J. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Vet. Immunol.** Immunopathol. 144:270–289.2011.



SILVA, I. J. O. Automação dos sistemas para aumento do conforto animal. Pirassununga, 2003. **Folheto Técnico**, NUPEA – ESALQ – USP. 2003.

SIMÕES, Tânia Valeska Medeiros Dantas.; OLIVEIRA, Amaury Apolônio Mastite bovina: considerações e impactos econômicos. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju. Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 170. 25 p. Disponível em [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/doc\\_170.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf). 2012.

SORIANI, N.; TREVISI, E.; CALAMARI, L. Relationships between rumination time, metabolic conditions, and health status in dairy cows during the transition period. **J. Anim. Sci.**.90:4544–4554 doi:10.2527/jas2012-5064, 2012.

STANGAFERRO, M. L.; WIJMA, R.; CAIXETA, L. S. et al. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part II. Mastitis **J. Dairy Sci.** 99:7411–7421. 2016.

STEENEVELD, W.; VERNOOIJ, J. C. M.; HOGEEVEEN, H. Effect of sensor systems for cow management on milk production, somatic cell count, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3896-3905, 2015.

SUN, Z. B. et al. Detection of mastitis and its stage of progression by automatic milking systems using artificial neural networks. **Journal of Dairy Research**. Hamilton, v. 77, n. 2, p. 168-175, 2010.