

CONSCIENTIZAÇÃO DOS PRODUTORES DE LEITE DA ZONA DA MATA MINEIRA SOBRE MÉTODOS DE PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA E ISOLAMENTO DOS SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS

Roberto Sousa Dias¹, Vinicius Silva Duarte¹, Victor Lopes Ribeiro Favaro¹, Hilário Cuquetto Mantovani², Cynthia Canêdo da Silva¹, Eduardo de Almeida Marques da Silva¹, Leandro Licursi de Oliveira¹, Sérgio Oliveira De Paula^{1*}

RESUMO – A mastite causa perda da qualidade do leite e riscos à saúde dos consumidores em virtude da presença de resíduos de antibióticos e microrganismos patogênicos, além de sérios prejuízos econômicos tanto para o produtor quanto para a indústria de laticínios. O conhecimento referente aos agentes causadores da doença, à sua evolução clínica e a fatores relacionados com o estabelecimento da infecção deve ser colocado em prática em programas de controle e prevenção da doença, visando o treinamento dos produtores, principalmente em respeito ao manejo adequado de ordenha. Neste trabalho, buscamos conscientizar produtores de leite da Zona da Mata mineira sobre a importância do controle e prevenção de mastite bovina e determinar seus principais agentes etiológicos. Identificamos 3,3% de casos de mastite clínica, 15% de subclínica e 81,7% de tetos sadios em vacas leiteiras da região. Como principais agentes etiológicos, foram isolados o *Staphylococcus aureus* em 28,52% dos casos e o *Staphylococcus sp.*, coagulase negativa, em 14,83%. Observamos também que poucos produtores da região possuem conhecimentos básicos sobre os métodos de prevenção e controle da mastite. Sendo assim, muitos carecem de programas de assistência técnica especializada, o que seria útil para o desenvolvimento de suas comunidades.

Palavras-chave: Agentes etiológicos, conscientização, mastite bovina, Zona da Mata mineira

AWARENESS OF DAIRY FARMERS IN THE ZONA DA MATA MINEIRA ON METHODS OF MASTITIS PREVENTION IN DAIRY CATTLE AND ETIOLOGICAL AGENTS ISOLATION

ABSTRACT – Mastitis causes loss of milk quality, health risks to consumers due to antibiotic residues and pathogenic microbes, and serious economic losses to both the grower and the dairy industry. The knowledge related to the causative species of the disease, clinical evolution and factors that favour the establishment of the infection should be prioritized. Improved control programs and disease prevention should be put into practice, aiming the suitable training of the producers, mainly referring to the proper handling of milking. In this work, we seek to carry out an awareness of the importance of bovine mastitis control and prevention in the Zona da Mata mineira and to determine the main etiological agents. We identified 3.3% of cases of clinical mastitis, 15% subclinical and 81.7% of ceiling healthy. The main etiologic agents were *Staphylococcus aureus* isolated in 28.52% of cases and *Saphylococcus sp.*, coagulase negative, 14.83%. We also observed that few producers in the region have basic knowledge about methods of mastitis prevention and control. Thus, many programs lack the specialized technical assistance, which would be useful for the development of their communities.

Key Words: Bovine mastitis, conscientization, etiological agents, Zona da Mata mineira

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa - UFV, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. ²Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa - UFV, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

*E-mail: depaula@ufv.br. Autor de correspondência.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é o mais freqüente causador de prejuízos aos produtores de leite no Brasil, sendo fator limitante na produtividade leiteira. Para que esta situação mude, é importante a conscientização do produtor sobre o correto manejo do controle da mastite, visto que muitos não percebem que todo o seu investimento em infra-estrutura e melhorias no plantel não terão efeito sem a implementação de um planejamento adequado para prevenção e controle da enfermidade (Fernandes, 2011).

De etiologia ampla, a mastite pode ser conceituada como uma inflamação da glândula mamária, sendo identificadas mais de 80 diferentes espécies de microrganismos causadores de mastite bovina. Os agentes etiológicos mais comumente isolados são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Dias, 2007).

De acordo com Radostits et al. (2002), o diagnóstico clínico de mastite é extremamente simples, sendo utilizados métodos convencionais de inspeção do animal e do leite, além da palpação da região do úbere. Porém, mastites subclínicas não são diagnosticadas pelos métodos usuais de exame clínico, sendo disseminadas para outros animais pelo fato de estarem subdiagnosticadas no rebanho, agravando os prejuízos devidos à transmissão para animais sadios.

Vários métodos são utilizados no diagnóstico de mastite subclínica nos rebanhos leiteiros, podendo-se citar a Contagem de Células Somáticas (CCS), o *California Mastitis Test* (CMT) e o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), de acordo com Jorge et al. (2005).

O aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS) é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica. O termo “células somáticas do leite” refere-se a células de origem sanguínea (leucócitos) e a células provenientes de descamação do epitélio glandular secretor. O estado de infecção é o principal responsável pela variação da CCS, sendo que as células de defesa correspondem de 98 a 99% das células somáticas encontradas no leite (Jorge et al., 2005).

O CMT é um dos testes mais populares e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica e tem como vantagem poder ser empregado no local e no momento em que os animais estão sendo ordenhados, além de ser prático, ter baixo custo e fornecer resultados imediatos (Jorge et al., 2005).

Para que a doença não se instale ou propague pelo rebanho leiteiro, um bom programa de prevenção e controle da mastite deve ser estabelecido com o objetivo de limitar a incidência/prevalência das infecções, reduzindo, por consequência, impactos econômicos na atividade leiteira. Para que seja efetivo, algumas metas devem ser atingidas: mão-de-obra especializada, monitoramento dos índices de mastite, higiene ambiental, tratamento da mastite clínica, tratamento de vaca seca, descarte de vacas com infecções crônicas, manejo e higiene na hora da ordenha, higienização e manutenção do equipamento de ordenha e até mesmo vacinação (Müller, 2002). Desta forma, é possível diminuir o número de animais acometidos por mastite clínica e subclínica, reduzir a taxa de novas infecções, melhorar a CCS do rebanho e a qualidade do leite produzido. Isto trará benefícios diretos aos produtores de leite, indústrias e consumidores (Rupp et al., 2000).

Em um estudo realizado por Coentrão et al. (2008) na Zona da Mata mineira, os principais fatores de risco para a ocorrência de mastite subclínica em um rebanho são: características dos

animais, o manejo inadequado, a inexistência de treinamento dos ordenhadores, a não utilização de serviços laboratoriais para identificação dos patógenos e o uso de equipamentos de ordenha sem manutenção periódica. O estudo ainda afirma que, apesar de mais fatores de risco estarem envolvidos no número de casos de mastite subclínica, estes podem ser priorizados no sentido de aprimorar programas de controle e prevenção da doença na região.

A antibióticoterapia ainda é o método mais utilizado no tratamento e prevenção da mastite, no entanto o surgimento de cepas mais virulentas e resistentes aos antibióticos comumente utilizados traz a necessidade de novas alternativas a este tipo de tratamento. Adicionalmente, os resíduos de antibióticos deixados no leite quando o período de carência não é respeitado são motivos de preocupação por questões de saúde pública. Sendo assim, a prevenção e o controle da enfermidade sem a necessidade do uso de antibióticos são formas mais desejáveis para se conter a mastite no rebanho leiteiro.

O presente estudo busca realizar um trabalho de conscientização sobre a importância da prevenção e controle da mastite bovina nos rebanhos leiteiros da região da Zona da Mata mineira como alternativa ao uso de antibióticos. Nesse trabalho, são apresentadas aos produtores técnicas que auxiliam na identificação de animais acometidos tanto pela forma clínica quanto pela subclínica, o que pode minimizar perdas econômicas aos produtores e laticínios e impedir consequências negativas para a saúde pública decorrentes do tratamento do gado leiteiro com antibióticos. Além disso, esse estudo contribui com a identificação da prevalência dos agentes etiológicos dos casos de mastite na região assistida e com a promoção da interação entre os produtores de leite das comunidades atendidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho e a divulgação entre as comunidades leiteiras da Região da Zona da Mata mineira, o projeto firmou parcerias com o Sindicato dos Produtores Rurais da cidade de Viçosa, com as Prefeituras Municipais de Coimbra e de Viçosa, com a Secretaria de Agricultura de Viçosa, com a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) e com o Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL-RV).

O trabalho de conscientização iniciou com visitas de cadastramento e aplicação de questionários aos produtores e retireiros com o intuito de traçar um perfil sobre o sistema de produção de leite em suas propriedades para que a assistência técnica posterior atendesse às necessidades de cada indivíduo. O questionário abordou: dados pessoais do produtor, número de animais em lactação, produção, produtividade, preço pago pelo leite e quais eram as técnicas aplicadas para prevenção e controle da mastite bovina durante a ordenha. Além do questionário, foram realizadas palestras nas comunidades leiteiras abrangendo o tema “CONTROLE E PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA”, visando principalmente reunir e despertar o interesse dos produtores e retireiros sobre o assunto. Para auxiliar na compreensão dos produtores durante a palestra e no decorrer das visitas técnicas, foram produzidos pela equipe

de trabalho, com o apoio da Universidade Federal de Viçosa, exemplares de uma cartilha contendo tópicos abordados durante as palestras e que seriam detalhados durante as visitas de assistência técnica.

Após a palestra e as primeiras visitas de cadastramento, os produtores receberam a equipe em suas propriedades para a visita técnica. Ao acompanhar o procedimento realizado pelo produtor, durante a primeira ordenha do dia, a equipe pôde analisar e aplicar medidas corretivas necessárias. Todas as indicações feitas pela equipe foram registradas para posterior análise do perfil dos produtores em relação ao conhecimento sobre o assunto.

Foi organizado, junto à EMATER-MG, o I Concurso Leiteiro em Nível de Cural que teve como objetivo incentivar os produtores a investir na produção de forma racional, levando em conta além da qualidade de leite, o aspecto nutricional, sanitário e reprodutivo. Além disso, o torneio leiteiro teve como importante objetivo realizar uma interação entre os produtores e suas respectivas comunidades.

Visando despertar o interesse dos produtores a investir em novas técnicas de manejo sanitário, que foram apresentadas como medidas corretivas e/ou preventivas, foi apresentado um cálculo do prejuízo financeiro decorrente dos casos de mastites clínicas e subclínicas segundo o Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL-RV), levando em consideração os seguintes fatores:

1) N° real de tetos = tetos sadios + (CMT+++x0,53)+(CMT++x0,75)+(CMT+x0,86), sendo CMT +++, CMT ++ e CMT +, os graus de mastite subclínica determinados por Barnumt & Newbouldt (1961).

2) Produção total estimada = Prod. Diária/n° real de tetos x n° de tetos do rebanho

3) Perda diária = Produção total estimada – Produção diária (L/dia)

4) Perda Mensal = Perda diária x 30,42

Os casos de mastite clínica foram diagnosticados segundo os sinais clínicos descritos por Radositis et al. (2002). Já os casos de mastite subclínica foram identificados segundo a metodologia de Barnumt & Newbouldt (1961).

Após o diagnóstico da doença, foram colhidas individualmente amostras de leite (4 mL) dos quartos mamários positivos aos métodos de diagnóstico, após a assepsia dos tetos, em tubos de ensaio esterilizados, devidamente identificados, acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e remetidas sob refrigeração ao Laboratório de Imunovirologia, Campus Viçosa, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar sangue desfibrinado de ovino a 5% e ágar Mac-Conkey, sendo incubadas a 37°C. As leituras foram realizadas em 24, 48, 72 e 96 horas sempre com a observação das características das colônias em cultura (morfologia, produção de pigmento e hemólise) e morfo-tintoriais, por meio da coloração de Gram, que permitiu uma visão preliminar das bactérias envolvidas no processo (QUINN et al., 1994). Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva, sendo calculado o número de casos de mastite clínica e subclínica e os microrganismos isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros meses de trabalho foram dedicados à confecção de uma cartilha com informações técnicas atualizadas e com ilustrações auto-explicativas, além de visitas para cadastramento e palestras nas comunidades. A cartilha e a palestra foram utilizadas como ferramentas para expor aos produtores a atual situação da mastite em propriedades de pequeno e médio porte na Zona da Mata mineira, proporcionando aos mesmos o desenvolvimento de um conhecimento prévio sobre o assunto. Durante as primeiras visitas técnicas observamos que muitos produtores já tinham a percepção da importância de se conhecer melhor o assunto relacionado com o tema.

As parcerias realizadas intermediaram a relação entre a equipe de trabalho e os produtores de leite da região. Foi realizado um total de 65 visitas, abrangendo comunidades como Cascalho, Córrego São João, Pedreira, Córrego do Silêncio, Zubá, Paiol, Santa Tereza e Coimbra. Os produtores assistidos pelo projeto apresentaram perfil de pequenos e médios produtores, com uma produção média de 120 litros/dia, média de 13 animais em lactação por propriedade, produção média por vaca de 9 litros e sistema de ordenha manual ou “balde ao pé”. Os produtores não recebiam assistência técnica periódica por médicos veterinários.

De acordo com dados obtidos do Diagnóstico da Pecuária Leiteira do Estado de Minas Gerais, publicado em 2005, na opinião de aproximadamente 49,5% dos produtores da Zona da Mata mineira o que falta para melhorar a qualidade do leite produzido na região é a orientação técnica. Cerca de 88% dos produtores e retireiros que participaram do projeto não tinham conhecimentos específicos sobre mastite bovina nem sobre os danos que a doença poderia causar à saúde animal. Cerca de 60% dos animais apresentaram algum grau de mastite subclínica ou clínica. Cerca de 85% dos produtores também não tinham conhecimentos sobre Terapia da Vaca Seca como forma preventiva e/ou terapêutica ou realizavam o método de forma incorreta no rebanho. Segundo Makovec & Ruegg (2003), a Terapia da Vaca Seca elimina até 80% das infecções existentes na secagem e também previne contra até 80% de novas infecções durante o período seco.

No presente estudo foi utilizado um total de 607 vacas (2408 tetos), os quais foram submetidos aos testes do CMT e da caneca de fundo preto, sendo que 440 tetos apresentaram algum sinal de mastite clínica ou subclínica (Figura 1), com cerca de 3,3% de casos de mastite clínica, 15% de mastite subclínica e 81,7% de tetos sadios, resultados similares aos encontrados por Oliveira et al. (2010). Os casos de mastite subclínica responderam por mais de 80% (Figura 2a-b) dos casos diagnosticados, com número de diagnósticos positivos para mastite subclínica 4,5 vezes superiores aos casos de mastite clínica (Figura 2c-d). É importante ressaltar que cerca de 63% dos proprietários e retireiros não tinham conhecimento sobre o CMT. Como a mastite subclínica não é identificável por intermédio de exames físicos convencionais, são necessários conhecimentos de técnicas mais específicas, como o CMT, para auxiliar na identificação dos animais acometidos e evitar a proliferação para os sadios.

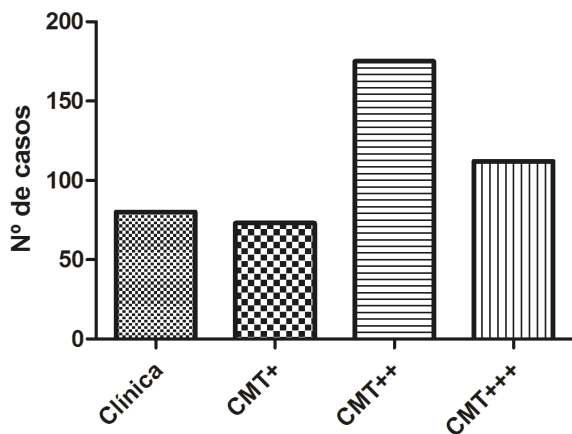


Figura 1. Número de casos dos diferentes graus de mastite subclínica (73-CMT +; 175-CMT ++ e 112-CMT +++) e mastite clínica (80) diagnosticados a partir da avaliação de 2408 tetos de vacas provenientes de rebanhos leiteiros em fazendas da Zona da Mata mineira.

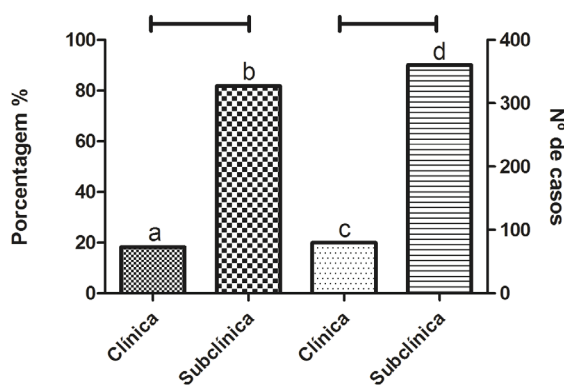


Figura 2. Relação entre os números de casos de mastite clínica e subclínica encontrados em rebanhos leiteiros na Zona da Mata Mineira. a-b) Porcentagem de casos encontrados nos rebanhos atendidos pelo projeto, com 18,2% de casos de mastite clínica e 81,8% de mastite subclínica. c-d) Número de casos encontrados, sendo 80 casos de mastite clínica e 360 de mastite subclínica.

Em geral, as principais perdas econômicas decorrentes da mastite bovina resultam de fatores, como: redução da quantidade/qualidade do leite e consequente comprometimento dos produtos derivados, descarte prematuro de animais, custos com drogas e com serviços veterinários e aumento da mão-de-obra (Radostits et al., 2002). Tomando como base o total de animais testados e uma produção total de aproximadamente 12.250 litros de leite diários (abrangendo todos os produtores visitados), a mastite causou um prejuízo total de 8,42%, ou seja, R\$ 1.125,96 por dia e R\$ 23.976,15 por mês, considerando o preço pago pelo leite na época de R\$ 0,70, em média. Esses números demonstram que as comunidades estavam deixando de aumentar suas rendas devido à ausência de atenção técnica especializada ou de programas que investem na conscientização

de produtores rurais sobre mastite bovina. Desta forma, além da capacitação técnica, por intermédio dos cálculos pudemos demonstrar qual a importância financeira da doença no rebanho leiteiro.

Concomitante com as visitas, foram coletadas amostras de leite mastítico para análise. Do total de 250 amostras analisadas, 58,18% apresentaram crescimento, sendo as colônias identificadas como *Staphylococcus aureus* (28,52%), *Staphylococcus* sp coagulase negativo (14,83%), *Streptococcus* sp (6,84%), bacilos gram-positivos (3,42%), leveduras (2,28%), coliformes (1,15%) e *Streptococcus agalactiae* (1,14%) - Figura 3.

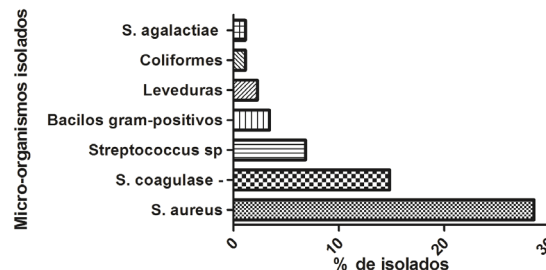


Figura 3. Espécies bacterianas isoladas a partir de amostras de leite coletadas durante as visitas técnicas. É possível observar a prevalência de *S. aureus* sobre as demais espécies encontradas. *S. aureus* (28,52%), *S. coagulase* - (14,83%), *Streptococcus* sp (6,84%), Bacilos gram-positivos (3,42%), Leveduras (2,28%), Coliformes (1,15%) e *S. agalactiae* (1,14%).

FAGUNDES et al. (2010), analisando 37 fazendas no estado de São Paulo, coletando um total de 208 amostras de vacas em lactação individualmente, identificou a presença de *Staphylococcus aureus* como causador da mastite subclínica em 6,7% das mesmas. A cepa enterotoxigênica se mostrou presente em 14,3% das amostras, o que representa o alto potencial do leite como causa de intoxicações alimentares quando não feito o manejo adequado do rebanho. É importante salientar que é difícil uma comparação dos resultados do presente estudo com outros, visto que a presença de *Staphylococcus aureus* como agente etiológico da mastite subclínica varia de acordo com a área estudada, práticas de manejo do rebanho e condições de higiene durante a ordenha, entre outros.

Outras atividades foram desenvolvidas pelo projeto, como o I Torneio Leiteiro em Nível de Curral e melhorias na infraestrutura em algumas propriedades. O campeão do I Torneio Leiteiro em Nível de Curral apresentou uma produção de aproximadamente 25 litros/animal, e todos os produtores, após o evento, alegaram a importância desse tipo de iniciativa, que ajuda a compartilhar conhecimentos entre produtores e até mesmo entre técnicos.

Na comunidade Cascalho, com o auxílio da EMATER-MG, dois produtores, além de adquirir os equipamentos necessários para o manejo higiênico recomendado, reconstruíram seus respectivos currais de ordenha. Antes da reforma, o curral de espera, que antecede a ordenha, não era concretado e continha grande quantidade de lama e fezes.

4. CONCLUSÕES

O trabalho de conscientização e qualificação da mão-de-obra no campo beneficiou diretamente mais de cinquenta famílias, consumidores de leite e laticínios compradores da matéria-prima produzida na região. Os produtores estão cientes da importância de se produzir leite livre de contaminações e dos programas que visam aprimorar a qualidade do leite, visto que segundo a Instrução Normativa 51, promulgada pelo Ministério da Agricultura em 2002, eles possuem o direito de receber bonificações por qualidade do leite pelos laticínios;

As técnicas de CMT, Terapia da Vaca Seca, Teste da Caneca de Fundo Preto ou Telado, de identificação de mastite clínica e de linha de ordenha serão fundamentais para diminuir o número de casos de mastite na região atendida;

O prejuízo estimado, referente à mastite bovina, está relacionado principalmente com a falta de assistência técnica periódica nas propriedades rurais e com a falta de incentivo e integração entre produtores e técnicos rurais. Por intermédio da integração realizada pelo projeto, tanto pelo Torneio Leiteiro quanto pelas palestras/visitas, os produtores e técnicos serão capazes de propagar as técnicas aprendidas para outras comunidades leiteiras da região.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto. VSD e VLRP foram bolsistas de extensão da Pró-reitoria de Extensão e Cultura (PEC) da Universidade Federal de Viçosa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNUMT, D.A.; NEWBOULDT, F.H.S. The use of the California Mastitis Test for the detection of bovine mastitis. **The Canadian Veterinary Journal**, v.2, n.3, p.83-90, 1961.

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, abr., 2008.

DIAS, R.V. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São

Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, 2010.

FERNANDES, D. AT Nº 37 - **Vaca seca: onde começa o lucro com leite**. Disponível em: Acessado em 29 maio 2007.

GOMES, S.T. **Diagnóstico da pecuária leiteira do Estado de Minas Gerais em. 2005: relatório de pesquisa**. – Belo Horizonte: FAEMG, 2006. p.51-77. 156 p.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B.; CORREA, R.C.; KASBURGO, D.G.; PICCININ, A.; VICTORIA, C.; DOMINGUES, P.F. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do Leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2039-45, 2005.

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3466-3472. 2003.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. UEM/CCA/DZO – NUPEL**, 2002. p.206-217.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T; BARBOSA, J.D. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the dairy region of Rondon do Pará, state of Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária**. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.99-111, 2000.