

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO  
CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE  
INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA CAUSADA POR  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

LÁRA CRISTINA BASTOS JULIANO

Botucatu – SP

Dezembro, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO  
CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE  
INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA CAUSADA POR  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

LÁRA CRISTINA BASTOS JULIANO

Dissertação apresentada junto ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Juliano, Lara Cristina Bastos.

Acurácia diagnóstica de meio cromogênico para detecção de infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* / Lara Cristina Bastos Juliano. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja

Capes: 50502018

1. Epidemiologia. 2. *Streptococcus agalactiae*.  
3. Mastite. 4. Compostos cromogênicos.

Palavras-chave: Cultura na fazenda; Epidemiologia;  
Estreptococos; Mastite contagiosa; Placa cromogênica.

Nome do Autor: Lára Cristina Bastos Juliano

Título: ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Marcella Zampoli de Assis

Membro

Laboratório de Microbiologia Veterinária

Instituto Federal Catarinense - Concórdia

20 de dezembro de 2022

**DEDICATÓRIA**

*Dedico esta dissertação à minha mãe Ana Cristina, por me dar forças para continuar  
seguindo os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Ana Cristina e Evandro, por todo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Ao meu irmão, Evandro Filho, por acrescentar tanto amor e luz ao meu caminho desde os seus primeiros passos.

Às minhas avós, por todo amor, cuidado, proteção e ensinamentos.

Aos meus “pais” Dirce e Ricardo e Maria Cristina e Ruy, por todo amor, carinho e por sempre estarem ao meu lado.

Às minhas amigas Bárbara e Thaline, por trazerem para a minha vida momentos incríveis, cheios de amor e apoio e por me mostrarem a força de uma amizade verdadeira.

À Jéssica e ao Artur, por sempre terem acreditado no meu potencial e por terem deixado marcas profundas de amor e força na minha vida.

A todos os meus amigos de Guaxupé, Poços de Caldas e meus amigos e colegas pós-graduandos, por todo apoio, ajuda e carinho.

À toda família da inspeção veterinária, pelo acolhimento e zelo desde o primeiro dia em que cheguei.

Agradeço ao meu orientador José Carlos de Figueiredo Pantoja, pela oportunidade, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, por acreditar no meu potencial e, junto de sua esposa Alessandra, terem se tornado pessoas extremamente especiais em minha vida.

À Ana Lúcia e Fausto por me receberem com carinho e zelo em sua residência durante a realização das atividades práticas do meu projeto de mestrado.

À professora Miriam da Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR) pela concessão do uso do Laboratório de Microbiologia para realização das análises e por toda ajuda durante o processo.

À instituição FMVZ-UNESP Botucatu pela oportunidade de crescimento profissional e à CAPES pela concessão da bolsa que possibilitou meus estudos e desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Diagnóstico microbiológico pelo método referência, Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) dos 100 isolados diagnosticados fenotipicamente como cocos catalase-negativa.....45

**Tabela 2.** Tabulação cruzada dos resultados do teste índice (meio cromogênico) e o método referência (Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz - MALDI-TOF MS) por ponto de corte e tipo de amostra (amostra de leite de quarto e composta) .....46

**Tabela 3.** Acurácia diagnóstica do teste de índice (meio cromogênico) para detecção de infecção intramamária por *Streptococcus agalactiae* por ponto de corte e tipo de amostra (amostra de leite de quarto e composta). O método referência foi a Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) .....47

**Tabela 4.** Prevalência e parâmetros de acurácia diagnóstica do meio cromogênico (teste índice) por fazenda para detecção de infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite de quarto .....48

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 5.</b> Associação entre as cores das colônias observadas no meio cromogênico (teste índice) e os resultados da Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS – método referência) em amostras de leite de quarto e compostas..... | 49 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 6.</b> Mudança nas cores das colônias entre as leituras de 24 e 48 horas após cultura do leite no teste índice (meio cromogênico) ..... | 50 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

**Figura 1.** Cores das colônias consideradas para definir os pontos de corte utilizados para definir infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae*. A: rosa; B: lilás; C: roxo e D: azul. Ponto de corte 1: isolamento de  $\geq 1$  colônia rosa na placa (instrução do fabricante); Ponto de corte 2: isolamento de  $\geq 1$  colônias nas cores rosa ou lilás na placa; Ponto de corte 3: isolamento de  $\geq 1$  colônias nas cores rosa, lilás ou roxo na placa. Colônias azuis foram consideradas negativas para *S. agalactiae* e positivas para *Streptococcus uberis*, *Lactococcus* spp. ou *Enterococcus* spp. ....51

**Figura 2.** Completude do conjunto de dados usado para avaliar a acurácia diagnóstica do meio cromogênico para detecção de infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae*. O método referência utilizado foi Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) ...  
.....52

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**16S rRNA** = RNA ribossomal 16S

**Bca** = Aminoácido de cadeia ramificada

**CAMP** = Christie, Atkins, Munch-Petersen

**CCS** = Contagem de células somáticas

**CMT** = Californian Mastitis Test

**CspA** = Serina protease

**Ct** = Cycle Threshold

**DNA** = Ácido desoxirribonucleico

**ES** = Especificidade

**FbsA** = Proteína de ligação ao fibrinogênio A

**FbsB** = Proteína de ligação ao fibrinogênio B

**FN** = Falso-negativo

**FP** = Falso-positivo

**GP** = “Gram-positive”

**IIM** = Infecção intramamária

**IM** = Intramuscular

**IMM** = Intramamário

**Lmb** = Proteína de ligação a laminina

**MALDI-TOF MS** = Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz

**MC** = Mastite clínica

**MSC** = Mastite subclínica

**PCR** = Reação em cadeia da polimerase

**PC1** = Ponto de corte 1

**PC2** = Ponto de corte 2

**PC3** = Ponto de corte 3

**qPCR** = Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SE** = Sensibilidade

**UFC** = Unidade formadora de colônia

**VPN** = Valor preditivo negativo

**VPP** = Valor preditivo positivo

$\alpha$  = Alfa

$\beta$  = Beta

$\gamma$  = Gama

## SUMÁRIO

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1.....                                                               | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                           | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                 | 14 |
| CAPÍTULO 2 – Trabalho científico .....                                        | 25 |
| ABSTRACT.....                                                                 | 27 |
| CAPÍTULO 3.....                                                               | 54 |
| DISCUSSÃO GERAL .....                                                         | 54 |
| CONCLUSÃO GERAL.....                                                          | 56 |
| REFERÊNCIAS.....                                                              | 57 |
| ANEXO I – Normas de publicação da revista Preventive Veterinary Medicine..... | 65 |

JULIANO, L. C. B. **Acurácia diagnóstica de meio cromogênico para detecção de infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae***. Botucatu, 2022. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia de um meio cromogênico experimental (OnFarm, Piracicaba, SP, Brasil) para a detecção de infecção intramamária (IIM) causada por *Streptococcus agalactiae* utilizando amostras de leite de quarto e compostas. Quatro rebanhos em MG foram visitados uma única vez para colher amostras de leite de quartos mamários de todas as vacas em lactação (N = 117). Amostras de quarto e compostas (produzidas no laboratório) foram cultivadas no meio cromogênico. Simultaneamente, as amostras de quarto foram semeadas em ágar sangue e os isolados cocos catalase-negativa foram enviados para identificação por Espectrometria de Massas de Tempo de Voo de Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Foram utilizados três pontos de corte para estimar os parâmetros de acurácia diagnóstica do meio cromogênico: PC1) isolamento de  $\geq 1$  colônia rosa, PC2)  $\geq 1$  colônia rosa ou lilás e PC3)  $\geq 1$  colônia rosa, lilás ou roxa. Considerando os três pontos de corte estudados, a acurácia diagnóstica utilizando amostras de quarto foi: sensibilidade (SE): 44,35-95,08%; especificidade (ES): 97,81-96,30%; valor preditivo positivo (VPP): 80,68-83,60% e valor preditivo negativo (VPN): 87,62-98,87%. Para as amostras compostas, a acurácia foi: SE: 54,05-89,19%; VPP: 90,90-94,29%; VPN: 82,11-95,12%. A ES (97,50%) se manteve a mesma nos três pontos de corte. O ponto de corte indicado pelo fabricante (PC1) resultou em baixa SE e alta proporção de resultados falso-negativos (FN). No entanto houve melhora da acurácia quando PC2 e PC3 foram utilizados.

**Palavras-chave:** mastite contagiosa, placa cromogênica, cultura na fazenda, estreptococos, epidemiologia.

JULIANO, L. C. B. **Diagnostic accuracy of chromogenic medium for detection of intramammary infection caused by *Streptococcus agalactiae***. Botucatu, 2022. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The objective was to evaluate the accuracy of an experimental chromogenic medium (OnFarm, Piracicaba, SP, Brazil) for the detection of intramammary infection (IMI) caused by *Streptococcus agalactiae* using quarter and composite milk samples. Four herds in MG were visited once to collect milk samples from the mammary quarters of all lactating cows (N = 117). Quarter and composite samples (produced in the laboratory) were plated on the chromogenic medium. Simultaneously, quarter samples were plated on blood agar and the catalase-negative cocci isolates were subjected for identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Three thresholds were used to estimate the diagnostic accuracy parameters of the chromogenic medium: T1) growth of  $\geq 1$  pink colony, T2)  $\geq 1$  pink or lilac colony, and T3)  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colony. Considering the three thresholds studied, the diagnostic accuracy using quarter samples was: sensitivity (SE): 44.35-95.08%; specificity (SP): 97.81-96.30%; positive predictive value (PPV): 80.68-83.60% and negative predictive value (NPV): 87.62-98.87%. For composite samples, the accuracy was: SE: 54.05-89.19%; PPV: 90.90-94.29%; NPV: 82.11-95.12%. The SP (97.50%) remained the same at the three thresholds. The threshold indicated by the manufacturer (T1) resulted in a low SE and a high proportion of false-negative (FN) results. However, there was an improvement in accuracy when T2 and T3 were used.

**Keywords:** contagious mastitis, chromogenic plate, on farm culture, streptococci, epidemiology.

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae* é um patógeno contagioso da mastite que ainda é prevalente em muitas regiões leiteiras do mundo. Estudos regionais relataram prevalência em nível de rebanho variando de 6,8% na Itália (TAMBA *et al.*, 2022), 29% na Alemanha (TENHAGEN *et al.*, 2006), 33,3% na Noruega (JØRGENSEN *et al.*, 2016), 47% na Colômbia (COBO-ÁNGEL *et al.*, 2018) e 40%-60% no Brasil (BRITO *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2012).

Os quartos mamários infectados subcl clinicamente com *S. agalactiae* produzem leite com alta contagem de células somáticas (CCS) ( $857 \times 10^3$  células/mL; DJABRI *et al.*, 2002) e podem disseminar  $10^7$  bactérias/mL (GUTERBOCK; BLACKMER, 1984), negativamente impactando a qualidade do leite e produtos lácteos (MA *et al.*, 2000). Vacas infectadas também apresentam diminuição da produção de leite (1,24 kg/vaca/dia dentro de três meses após o diagnóstico), em comparação com vacas saudáveis (HOLMØY *et al.*, 2019).

Embora *S. agalactiae* possa se espalhar rapidamente dentro do rebanho, um programa eficiente de diagnóstico e tratamento permite a erradicação do patógeno, quando são adotadas práticas de manejo, como higiene adequada na ordenha e remoção de vacas infectadas cronicamente (MAHMMOD *et al.*, 2015). A *blitz* terapia consiste na identificação e tratamento simultâneo de todas as vacas infectadas por *S. agalactiae* no rebanho, até que a erradicação seja alcançada.

Nos programas de *blitz* terapia, a cultura do leite em ágar sangue tem sido o método de referência para diagnosticar a infecção intramamária (IIM) causada por *S. agalactiae* para triagem do rebanho e avaliação da cura bacteriológica pós-tratamento. A sensibilidade (SE) e a especificidade (ES) de uma única cultura foram relatadas como 95,6% e 99,5% para amostras de leite compostas (ROSSI *et al.*, 2018) e 98,8% e 100% para amostras de leite de quarto (DINSMORE *et al.*, 1991), respectivamente. No entanto, a cultura tradicional requer profissionais qualificados, o envio das amostras para o laboratório (2-3 dias) e 2-3 dias adicionais até o diagnóstico final (HOGAN *et al.*, 1999; RUEGG, 2003).

Como alternativa para agilizar e simplificar o processo diagnóstico, a cultura de leite na própria fazenda com meios cromogênicos tem sido cada vez mais utilizada em todo o mundo. Sensibilidade e ES de 89,1% e 96,3% foram relatadas para detecção de

35 *Streptococcus* spp. com o uso de meio cromogênico na fazenda, embora a diferenciação  
36 de *S. agalactiae* de outros estreptococos não tenha sido possível (GARCIA *et al.*, 2021).  
37 O desenvolvimento de novos meios que possam identificar *S. agalactiae* com alta SE ( $\geq$   
38 90%) e baixo percentual de resultados falso-negativos (FN) são cruciais para uma  
39 erradicação mais eficiente do patógeno de rebanhos leiteiros (LAGO *et al.*, 2011).

40 Assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) Avaliar a acurácia diagnóstica de  
41 um meio cromogênico experimental para detecção de IIM causada por *S. agalactiae*  
42 usando amostras de leite de quarto e compostas, e 2) Avaliar a concordância entre  
43 observadores para interpretar os resultados da cultura.

44

## 45 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

46

### 47 **2.1. Mastite por *Streptococcus agalactiae***

48

#### 49 **2.1.1. Etiologia**

50 *Streptococcus agalactiae* é um estreptococo do grupo B de *Lancefield*  
51 caracterizado como patógeno contagioso da mastite (FALLON, 1974), capaz de colonizar  
52 a pele do teto e invadir a glândula mamária de forma ascendente. A capacidade de viver  
53 na superfície epitelial dos tecidos da cisterna e dos ductos permite que *S. agalactiae* cause  
54 danos celulares através da produção de ácido lático e consequente inflamação  
55 (EDMONDSON, 1989; NMC, 2015).

56 Na glândula mamária, *S. agalactiae* possui capacidade de formar biofilme e causa  
57 primariamente MSC. Há 10 sorotipos conhecidos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX)  
58 com patogenicidade variável. O patógeno é relevante para humanos, uma vez que é capaz  
59 de causar meningite em neonatos. Ademais, as cepas ST-23 e ST-61 isoladas de humanos  
60 pertencentes aos sorotipos Ia e II têm sido relacionadas geneticamente às cepas ST-23 e  
61 ST-17 de bovinos (PANG *et al.*, 2017; KABELITZ *et al.*, 2021).

62 *Streptococcus agalactiae* possui dois fatores de virulência denominados Bca e  
63 Lmb, que possibilitam a invasão nas células do hospedeiro. Para que a evasão imune  
64 ocorra, há produção de proteínas como FbsA e FbsB envolvidas na ligação do  
65 fibrinogênio que, consequentemente, diminui o risco de opsonização pelas células  
66 fagocíticas. Além disso, a síntese de CspA por *S. agalactiae* induz a clivagem com  
67 quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos (KABELITZ *et al.*, 2021).

### 68 2.1.2. Epidemiologia

69 Considerando que *S. agalactiae* ainda é prevalente no Brasil e em outras regiões  
70 do mundo, estudos epidemiológicos são importantes para o diagnóstico situacional e  
71 implementação de programas de erradicação do patógeno (RUEGG, 2017).

72 No Brasil, Brito *et al.* (1999) reportaram no estado de Minas Gerais prevalência  
73 de *S. agalactiae* de 60% (29/48) em nível de rebanho, dentre os quais, 24 possuíam, em  
74 média, 2,7% de quartos infectados. No mesmo estado, Elias *et al.* (2012) reportaram  
75 prevalência de 39,7% (98/247) deste patógeno em amostras de leite de tanques de  
76 refrigeração no mesmo estado. Rossi *et al.* (2018) descreveram, em um estudo realizado  
77 em sete fazendas nos estados de Minas Gerais e São Paulo, valores de prevalência de *S.*  
78 *agalactiae* de 13% (184/1164) e 25,6% (83/291) em nível de quarto e vaca,  
79 respectivamente. Recentemente, Dalanezi *et al.* (2020) desenvolveram estudo no estado  
80 de São Paulo em cinco rebanhos com CCS do leite do tanque  $< 400 \times 10^3$  células/mL e  
81 observaram no grupo de vacas diagnosticadas com patógenos primários, prevalência de  
82 *S. agalactiae* de 25,5% (94/369).

83 Assim como no Brasil, a ocorrência e as características das mastites causadas por  
84 *S. agalactiae* vêm sendo reportadas em outros países. Em estudo recente realizado por  
85 Tamba *et al.* (2022) na região de Emilia-Romagna, Itália, investigou-se a eficiência de  
86 um programa de controle de *S. agalactiae* em uma população de 2.831 rebanhos, dos  
87 quais 6,8% eram positivos para o patógeno. O número básico de reprodução ( $R_0 = 1,4$ )  
88 reportado indicava uma dispersão ativa deste patógeno nos rebanhos, representando  
89 quantos animais saudáveis um animal positivo é capaz de infectar dentro dos rebanhos.

90 Cobo-Ángel *et al.* (2018) realizaram estudo longitudinal na Colômbia incluindo  
91 152 rebanhos, dos quais, *S. agalactiae* foi isolado de 47% (72/152). Subsequentemente,  
92 os mesmos autores conduziram estudo transversal em 25 rebanhos selecionados do estudo  
93 longitudinal, onde foram colhidas amostras compostas de leite de todas as vacas, amostras  
94 de *swabs* retais e amostras ambientais (paredes, comedouros e cocho de água). Dentre  
95 todas as amostras colhidas, a prevalência de *S. agalactiae* foi de 13% (207/1712) nas  
96 amostras de leite, 2% (32/1545) nas amostras de *swabs* retais e 2% (3/181) nas amostras  
97 ambientais (COBO-ÁNGEL *et al.*, 2018).

98 Na Alemanha, em estudo com 80 rebanhos de CCS média no leite do tanque de  
99  $372 \times 10^3$  células/mL, foram colhidas amostras de animais clinicamente saudáveis e em  
100 diferentes estágios de lactação. Os autores encontraram prevalência de 0,7% (70/9910)  
101 de *S. agalactiae* em amostras de leite de quarto mamário. Além disso, a prevalência em

nível de quarto foi maior em vacas mais velhas (paridade  $\geq 2$ ), das quais 1,1% (27/2474) e 0,9% (22/2475) em começo e final de lactação, respectivamente (TENHAGEN *et al.*, 2006).

Demil *et al.* (2022), em estudo transversal desenvolvido na Etiópia com 419 quartos mamários positivos ao *California Mastitis Test* (CMT) de 81 rebanhos, a prevalência de *S. agalactiae* foi de 9,3%. Na Espanha, Azevedo *et al.* (2016) colheram amostras de tanque de refrigeração de 92 rebanhos com histórico de alta CCS individual dos animais. Dentre as amostras de leite de tanque, a prevalência de *S. agalactiae* foi de 32,6%.

Em estudo conduzido por Bi *et al.* (2016) na China, foram colhidas amostras de leite do tanque de refrigeração de 894 rebanhos, das quais *S. agalactiae* foi isolado de 92,2%. No subconjunto de 583 rebanhos que possuíam dados de CCS do leite do tanque, *S. agalactiae* estava presente em 97,9% dos rebanhos e a média geométrica da CCS foi  $650 \times 10^3$  células/mL. Os autores observaram práticas de manejo que poderiam contribuir com a alta prevalência reportada, tais como a mistura de vacas sadias e infectadas na ordenha e movimentação de animais entre as propriedades.

Leelahapongsathon *et al.* (2016) estudaram surtos de mastite por *S. agalactiae* em dois rebanhos na Tailândia e estimaram parâmetros epidemiológicos até então nunca reportados. A prevalência de IIM por *S. agalactiae* no início do estudo era de 63% (N = 16) e 36% (N = 63) em nível de vaca e quarto, respectivamente. Por meio de amostragem longitudinal, os autores observaram duração média das IIM de 270,84 dias. O R0 (1,86 animal/rebanho) e a taxa de transmissão ( $\beta = 0,0068$  quarto/dia) reportados indicavam a dispersão deste patógeno no rebanho, representando quantos animais saudáveis um animal positivo pôde infectar e quantos quartos foram infectados por dia a partir de um indivíduo infectado, respectivamente. A taxa de cura espontânea entre os nove momentos de amostragem variou entre 0 e 14,3%, sugerindo a necessidade de tratamento com antimicrobianos. A taxa de incidência (0,09) de IIM demonstrou que, na presença de vacas infectadas, 9% dos quartos saudáveis desenvolveram uma nova infecção por *S. agalactiae* dentro de 30 dias (ROSSI *et al.*, 2018). Os autores associaram o surto de *S. agalactiae* à má implementação de medidas de controle de mastite, tais quais o uso de pano comum para limpar e secar os tetos, ausência de pós-dipping, ausência de tratamento de vaca seca, não segregação de animais infectados e não remoção de animais crônicos do rebanho.

135 Deng *et al.* (2021) desenvolveram na Holanda estudo longitudinal, no qual foram  
136 colhidas 317 amostras de leite de quarto de 81 vacas em lactação que eram ordenhadas  
137 em sistema automatizado. A duração média das infecções por *S. agalactiae* demonstrada  
138 neste estudo foi de 86 dias. O valor reportado de  $\beta$  (0,007 quarto/dia) foi similar àquele  
139 demonstrado por Leelahapongsathon *et al.* (2016), o que sugere que *S. agalactiae*  
140 consegue se disseminar facilmente no rebanho, mesmo em sistemas de ordenha  
141 automatizada.

142 Na Noruega, Jørgensen *et al.* (2016) conduziram estudo longitudinal em quatro  
143 fazendas com histórico de *S. agalactiae*. Foram colhidas amostras de leite de tanque de  
144 refrigeração, *swabs* retais e amostras ambientais, nas quais a prevalência do patógeno foi  
145 de 33,3% (5/15), 5% (43/860) e 18,5% (87/470), respectivamente. Adicionalmente, os  
146 mesmos autores conduziram estudo transversal em 37 fazendas, das quais 15 possuíam  
147 histórico de *S. agalactiae*. Foram colhidas amostras ambientais de diferentes pontos da  
148 sala de ordenha e a prevalência de *S. agalactiae* foi de 25,5% (51/200) (JØRGENSEN *et*  
149 *al.*, 2016).

150 Na Noruega (JØRGENSEN *et al.*, 2016), assim como na Colômbia (COBO-  
151 ÁNGEL *et al.*, 2018) foi demonstrado que *S. agalactiae* não é considerado patógeno IMM  
152 obrigatório, pois este pode estar presente no trato gastrointestinal dos bovinos. Estes  
153 resultados reforçam que a transmissão oro-fecal de *S. agalactiae* deve ser considerada em  
154 rebanhos leiteiros. Dessa forma, são propostos dois ciclos de transmissão de *S. agalactiae*  
155 a serem considerados para o manejo adequado: 1) ciclo contagioso entre os animais, via  
156 ordenha, e 2) ciclo oro-fecal, via ambiente e água (JØRGENSEN *et al.*, 2016).

157 No mesmo rebanho foram encontradas mais de um tipo de cepa (ST356, ST1 e  
158 ST718), o que foi significativamente associado à frequente introdução de novos animais  
159 (compra) (COBO-ÁNGEL *et al.*, 2018). Na Noruega, no estudo mencionado previamente  
160 (JØRGENSEN *et al.*, 2016), as cepas ST1 e ST130 foram isoladas de *swabs* retais e  
161 vaginais de vacas, e de *swabs* de garganta de bezerros e amostras ambientais,  
162 respectivamente.

163 É importante salientar o potencial zoonótico de *S. agalactiae*, uma vez que Zadoks  
164 *et al.* (2011) já haviam descrito similaridade de genes de virulência entre isolados obtidos  
165 de humanos e animais. Ademais, a reemergência do patógeno em algumas fazendas pode  
166 estar relacionada a vias de transmissão partindo de humanos para animais, como peixes  
167 e bovinos (CRESTANI *et al.*, 2021). Em humanos, o patógeno é capaz de colonizar os  
168 sistemas gastrointestinal e genital feminino, e comprometer a gestação, causando

meningite em neonatos e nascimento de prematuros (SEALE *et al.*, 2017). Em estudo com isolados de *S. agalactiae* provenientes de amostras de leite de vacas com mastite, e de swabs vaginais ou retais de mulheres grávidas, todos os isolados (N = 144) demonstraram 58% de similaridade genética (MARTINEZ *et al.*, 2000).

### 2.1.3. Impacto econômico

A ocorrência da mastite clínica (MC) e MSC no rebanho acarreta perdas econômicas importantes, associadas principalmente à diminuição na produção leiteira e ao descarte dos animais cronicamente infectados (HALASA *et al.*, 2007; PAL; REGASA; GIZAW, 2019). Hogeveen *et al.* (2011) estimaram a perda econômica anual devido à MC variando entre €61 e €97, além de perdas adicionais devido à MSC de €13 em média por vaca.

Contagem de células somáticas no leite do tanque  $> 1000 \times 10^3$  células/mL são comuns em propriedades nas quais *S. agalactiae* está presente (KEEFE, 2012). Djabri *et al.* (2002) reportaram, em uma meta-análise, média geométrica de CCS de quartos infectados por *S. agalactiae* de  $857 \times 10^3$  células/mL.

Tamba *et al.* (2022) observaram que houve adição de  $77 \times 10^3$  células/mL na CCS do tanque de refrigeração em rebanhos positivos para *S. agalactiae*, em relação a rebanhos negativos para o patógeno, correspondendo a perda de leite de 0,4 Kg/vaca/dia.

Holmøy *et al.* (2019) constataram que vacas positivas para *S. agalactiae* produziram 0,13 Kg e 1,24 Kg de leite/dia a menos do que vacas saudáveis no período imediato e de dois a três meses após o diagnóstico, respectivamente. Neste mesmo estudo, foram identificadas as cepas de *S. agalactiae* ST1 e ST103, que foram associadas a perdas de 3,0 e 1,5 Kg de leite/vaca/dia, respectivamente. Em vacas infectadas pela cepa ST1, a maior perda leiteira ocorreu entre o primeiro e segundo mês a partir do diagnóstico. Após este período, os animais recuperaram moderadamente a produção. No entanto, nas vacas infectadas pela cepa ST103, a diminuição na produção leiteira persistiu pelo período restante da investigação. As cepas ST103 e ST1 foram associadas a valores de CCS de  $330 \times 10^3$  células/mL e  $371 \times 10^3$  células/mL, respectivamente.

## 2.2. Diagnóstico da mastite

### 2.2.1. Tipos de amostras

A maioria dos programas de controle de mastite incluem inicialmente análise microbiológica de amostras de quarto ou amostras compostas para determinar qual é a distribuição de patógenos presentes no rebanho. Para tanto, as amostras compostas são utilizadas frequentemente com o intuito de reduzir os custos com laboratório e mão-de-obra (RUEGG, 2003).

Dinsmore *et al.* (1991) avaliaram parâmetros de acurácia de diferentes métodos de amostragem e cultura do leite para detectar IIM por *S. agalactiae*. Para as amostras de quarto, os valores de SE e ES variaram entre 97,7- 98,8% e 98,8-100%, respectivamente. Enquanto nas amostras compostas, foram observados valores de SE e ES entre 95,3-98,8% e 97,5-100%, respectivamente.

Com o intuito de aprimorar o isolamento de *S. agalactiae*, foi demonstrado que o volume de leite (0,01 ou 0,05 mL) cultivado na placa não influenciou a SE da cultura microbiológica (DINSMORE *et al.*, 1991), pois *S. agalactiae* é um microrganismo que é eliminado em alta concentração no leite ( $10^7$  bactérias/mL), facilitando o isolamento na meio de ágar sangue (GUTERBOCK; BLACKMER, 1984).

Rossi *et al.* (2018) avaliaram parâmetros de acurácia de amostras de leite compostas utilizando amostras de quarto como método referência. Os valores de SE e ES para detecção de *S. agalactiae* obtidos foram de 95,6% e 99,5%, respectivamente.

É interessante ressaltar que, mesmo que os valores de SE para amostras compostas sejam usualmente menores do que de amostras de quarto, Rossi *et al.* (2018) obtiveram o coeficiente de concordância Kappa de 0,90 entre os dois tipos de amostra. Este resultado sugere que as amostras compostas podem ser adequadas para o diagnóstico de mastite causada por *S. agalactiae*, reduzindo as despesas e mão-de-obra.

### 2.2.2. Métodos laboratoriais fenotípicos

O método de diagnóstico padrão de mastite é a cultura microbiológica utilizando amostras de quarto ou compostas (RUEGG, 2003). A identificação fenotípica de *S. agalactiae* se inicia pela observação em ágar sangue de colônias pequenas e translúcidas com 24 horas de incubação, além da produção de hemólise nos padrões alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ou gama ( $\gamma$ ). *Streptococcus agalactiae* são cocos gram-positivos, catalase-negativa, e negativos à hidrólise de esculina e bile-esculina. O patógeno produz a reação de Christie,

237 *Atkins, Munch-Petersen* (CAMP) sinergicamente à  $\beta$ -hemolisina produzida por  
238 *Staphylococcus aureus*, produzindo hemólise com aspecto de seta no ágar sangue  
239 (DINSMORE *et al.*, 1991; MARKEY *et al.*, 2013).

240

### 241 2.2.3. Métodos moleculares

242 Outras formas de diagnosticar os patógenos da mastite são os métodos  
243 moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e o  
244 MALDI-TOF MS (DUARTE; FREITAS; BEXIGA, 2015).

245 A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação de  
246 um fragmento do DNA (ácido desoxirribonucleico) de uma bactéria viva, inibida ou  
247 morta. A síntese de DNA de forma exponencial ocorre após a ligação de um primer às  
248 extremidades da fita e ao final de 30 a 40 ciclos é gerado um produto da PCR que será  
249 lido em eletroforese em gel. A qPCR possui a capacidade de detectar e quantificar os  
250 produtos da técnica durante a amplificação do DNA, utilizando sondas fluorescentes,  
251 tornando-a mais rápida (CAI *et al.*, 2003).

252 Mahmmoud (2013) utilizou análise de classe latente para estimar parâmetros de  
253 acurácia entre as técnicas de qPCR PathoProof Mastitis™ (Thermo Scientific Finnzymes  
254 Diagnostic Products and Services, Espoo, Finlândia) e cultura microbiológica. A SE e a  
255 ES estimadas para detecção de *S. agalactiae* entre os pontos de corte  $\leq 32$  e  $\leq 39$  de *cycle*  
256 *threshold* (Ct) foram de 73,9% a 96,2% e 97,22% a 96,8 % para o PathoProof™ e de  
257 72,1% a 25,7% e 98,9% a 99,7% para a cultura microbiológica, respectivamente.

258 A técnica de MALDI-TOF MS vem sendo utilizada para diagnosticar os  
259 patógenos da mastite e requer cultura prévia em ágar sangue do isolado a ser identificado.  
260 Posteriormente, o isolado é fixado em uma placa onde será feita a extração das proteínas  
261 e fixação em matriz orgânica, a qual sofre a incidência de um raio laser passando por  
262 vaporização e ionização das biomoléculas. Estes íons se separam e a razão massa/carga é  
263 medida com base no tempo de voo pelo tubo de vácuo do equipamento, gerando um  
264 gráfico de espectros dos isolados que é comparado aos espectros do banco de dados. Os  
265 escores em log de 0 a 3 são calculados pelo equipamento, interpretados como:  $< 1,7$ : não  
266 identificação,  $1,7 \geq x < 2,0$ : identificação em nível de gênero e  $\geq 2$ : identificação em nível  
267 de espécie (SINGHAL *et al.*, 2015; NONNEMANN *et al.*, 2019).

268 O método MALDI-TOF MS não é capaz de identificar amostras com mais de uma  
269 espécie bacteriana e por isso é necessária a cultura prévia do isolado (DUARTE;  
270 FREITAS; BEXIGA, 2015; NONNEMANN *et al.*, 2019). Entretanto, Barreiro *et al.*

(2017) demonstraram que, em concentração  $\geq 10^8$  de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL no leite, *S. agalactiae* pode ser detectado diretamente da amostra.

#### 2.2.4. Métodos diagnósticos utilizados na fazenda

Apesar de a cultura microbiológica ainda ser considerada um dos métodos de referência para o diagnóstico da mastite, o tempo entre a colheita do leite na fazenda, envio ao laboratório e término do exame laboratorial (48 – 72h) pode dificultar programas de erradicação de *S. agalactiae* que dependem do diagnóstico rápido para o manejo dos animais. Dessa forma, a cultura na fazenda em meios cromogênicos tem sido proposta para diminuir o tempo de diagnóstico e manter níveis de acurácia não inferiores à cultura microbiológica convencional, bem como nortear a tomada de decisões de tratamento, favorecendo o uso racional de fármacos (LAGO *et al.*, 2011; KABELITZ *et al.*, 2021)

Os casos de MSC são desafiadores, pois não há alterações visíveis no leite. A forma tradicional e efetiva de detecção dos casos de MSC é a partir de testes de CCS e cultivo microbiológico (BENÍĆ *et al.*, 2018). A CCS do leite do tanque pode ser considerada um dos pontos de referência na identificação primária de problemas com mastite (RUEGG, 2003), uma vez que existem registros de CCS de tanque de expansão  $> 700 \times 10^3$  células/mL em rebanhos acometidos por *S. agalactiae* (ERSKINE;EBERHART, 1990).

O teste de CMT é um indicador qualitativo da CCS do leite e pode ser útil para detecção de alta CCS em nível de vaca no momento da ordenha. Este teste é feito com a utilização de reagente que causa a ruptura da membrana celular de qualquer célula presente na amostra de leite, resultando em aumento da viscosidade da mistura leite-reagente (PAL;REGASA;GIZAW, 2019; KABELITZ *et al.*, 2021). Rossi *et al.* (2018) demonstraram parâmetros de acurácia para os diferentes pontos de corte do teste de CMT (suspeito, 1, 2 e 3) em sete rebanhos. Os valores de SE e ES variaram entre 91,9% e 81,2% e 82,7% e 94,7%, respectivamente,

Dois estudos realizados simultaneamente por Ganda *et al.* (2016) nos Estados Unidos, tiveram o objetivo de identificar patógenos em amostras de leite de quartos com MC por meio da cultura no meio cromogênico Accumast (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY). No primeiro estudo, foi utilizada a cultura microbiológica do leite como método referência para obtenção dos parâmetros de acurácia (SE, ES, valor preditivo positivo [VPP] e valor preditivo negativo [VPN]) (N = 538) da placa cromogênica. No segundo estudo, o sequenciamento 16S rRNA foi utilizado como referência para a

305 obtenção do VPP (N = 214). Os valores de acurácia obtidos no primeiro estudo para  
306 detecção de *Streptococcus* spp. foram: SE = 90,0%, ES = 92,9%, VPP = 91,8% e VPN =  
307 91,2%. O VPP obtido no segundo estudo em relação à detecção de *Streptococcus* spp.  
308 pelo meio cromogênico foi de 95,0%, além do valor do coeficiente Kappa (0,89), que  
309 sugere concordância quase perfeita (DOHOO *et al.*, 2003) entre o meio e o  
310 sequenciamento.

311 Os parâmetros de acurácia do meio cromogênico *Gram-positive* (GP) para  
312 detecção de *S. agalactiae*/*S. dysgalactiae* (não é possível a diferenciação entre os  
313 patógenos) em amostras de leite de casos de MSC foram: SE = 89,1%, ES = 96,3%, VPP  
314 = 70,7% e VPN = 98,9%. Neste caso, o MALDI-TOF MS foi utilizado como método  
315 referência e o coeficiente Kappa calculado (0,76) demonstrou concordância substancial  
316 entre os métodos (GARCIA *et al.*, 2021).

317 Como descrito nos estudos revisados, a SE de diferentes meios cromogênicos para  
318 detecção de *Streptococcus* spp. e *S. agalactiae* varia entre 89,1% e 90,0%. Contudo, ao  
319 considerar *S. agalactiae* e sua dinâmica no rebanho, valores de SE e ES acima de 90,0%  
320 são essenciais, visto que a prioridade do programa de testagem é reduzir a proporção de  
321 resultados FN. Vacas infectadas e não identificadas pela cultura atuam como reservatórios  
322 do patógeno no rebanho (LAGO *et al.*, 2011). Devido à disponibilidade comercial de  
323 novos meios cromogênicos específicos para *S. agalactiae*, há necessidade de realização  
324 de estudos para testar a acurácia diagnóstica de tais métodos em situações de campo e,  
325 dessa forma, contribuir para melhoria da eficácia de programas de erradicação.

326

### 327 2.3. Tratamento

328 A abordagem utilizada para tratamento e erradicação de *S. agalactiae* é  
329 denominada *blitz* terapia, que consiste na identificação e tratamento de todos os animais  
330 positivos do rebanho (EDMONDSON, 2011).

331 A primeira etapa da *blitz* terapia é baseada na identificação dos animais positivos  
332 para *S. agalactiae* por meio da cultura microbiológica do leite de amostras de quarto ou  
333 compostas. Subsequentemente, estes animais devem ser separados dos animais saudáveis  
334 e o tratamento deverá ser instituído com o antimicrobiano de escolha por dois a três dias  
335 consecutivos, em intervalos de 12 a 24 horas (FARNSWORTH; STEWART; REID,  
336 2003). Após 14 e 21 dias do primeiro tratamento, a cultura microbiológica do leite de  
337 todos os animais do rebanho deverá ser repetida para posterior tratamento dos animais

338 remanescentes infectados, até que se obtenha a cura bacteriológica de todas as vacas  
339 (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003).

340 Reyes *et al.* (2015), em estudo desenvolvido na Colômbia com 17 rebanhos,  
341 investigaram as taxas de cura de dois antimicrobianos administrados por duas vias  
342 diferentes como tratamento de *S. agalactiae* pela abordagem da *blitz* terapia. As 248 vacas  
343 incluídas foram alocadas aleatoriamente em um grupo tratado com ampicilina e  
344 cloxacilina, pela via IMM, e a outro grupo tratado com hidróido de penetamato, pela  
345 via intramuscular (IM); as taxas de cura obtidas foram de 82,4% e 65,8%,  
346 respectivamente.

347 Em estudo clínico randomizado realizado em nove rebanhos no Brasil (Rossi *et al.*,  
348 2019) comparou-se a eficácia de três tratamentos a um grupo controle negativo em vacas  
349 infectadas com *S. agalactiae*. As taxas de cura obtidas após 14 dias do tratamento em  
350 cada grupo foram: cloxacilina e ampicilina IMM = 86,02%; cefquinoma IMM = 97,89%;  
351 cefquinoma IM = 54,84% e grupo controle negativo = 25,00%.

352 Yamagata *et al.* (1987) avaliaram o custo da *blitz* terapia em rebanho de 627 vacas  
353 em lactação na Califórnia. O tratamento foi instituído com penicilina e novobiocina IMM  
354 em 99 animais e a taxa de cura obtida foi de 98%. O custo total por vaca tratada foi de  
355 \$77. Os autores reportaram benefícios de \$396 e \$237/vaca para animais tratados no  
356 início e meio de lactação, respectivamente. Por outro lado, houve prejuízo de \$55/vaca  
357 para animais tratados no final de lactação.

358 Edmondson (1989) reportou benefício geral de £1109 atribuído a aplicação da  
359 *blitz* terapia em um rebanho de 240 vacas em lactação, além de aumento na porcentagem  
360 de gordura e menor perda na concentração de proteínas no leite. O antimicrobiano de  
361 escolha foi a eritromicina aplicada via IMM.

362 Erskine e Eberhart (1990) instituíram a *blitz* terapia e utilizaram os  
363 antimicrobianos novobiocina e penicilina G procaína como tratamento em vacas de 12  
364 rebanhos na Pensilvânia, EUA. A eficácia observada foi de 92,6% (N = 305) para quartos  
365 mamários e de 88,3% (N = 113) para as vacas. Além disso, os autores reportaram custo  
366 médio de \$30,87 por animal tratado.

367

## 368 2.4. Controle

369 Além do tratamento com antimicrobianos, os fatores de risco associados à  
370 infecção por *S. agalactiae* devem ser cuidadosamente monitorados (FARNSWORTH;  
371 STEWART; REID, 2003). Visto como base dos programas de erradicação de patógenos

372 contagiosos causadores de mastite, o “programa de cinco pontos” proposto em 1960  
373 (NEAVE *et al.*,1969) propõe métodos essenciais no programa de erradicação de *S.*  
374 *agalactiae*. Ações como a realização correta do pós-*dipping*, segregação de animais  
375 infectados e cultura microbiológica do leite de todos os animais recém-introduzidos no  
376 rebanho, ou que apresentem aumento de CCS, são essenciais para o bom desempenho da  
377 *blitz* terapia (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003; EDMONDSON, 2011). A  
378 secagem antecipada de animais infectados, acompanhada da terapia da vaca seca e o  
379 monitoramento epidemiológico por meio da cultura do leite de animais recém paridos,  
380 que apresentam mastite clínica e com alta CCS ( $> 200.000$  células/mL), são relevantes  
381 para confirmar a erradicação do patógeno do rebanho.

382 Mweu *et al.* (2012) associaram a reemergência de *S. agalactiae* entre os anos 2000  
383 e 2009 na Dinamarca com o possível surgimento de uma nova e adaptada cepa do  
384 patógeno, devido à negligência na implementação das medidas de controle da mastite.  
385 Ademais, Churakov *et al.* (2021) relataram que a compra de animais esteve associada ao  
386 risco de transmissão do patógeno, especialmente para cepas ST103.

1    **CAPÍTULO 2 – Trabalho científico**

2

3    **Artigo a ser enviado para a revista *Preventive Veterinary Medicine***

4    (Normas de publicação – ANEXO I)

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Diagnostic accuracy of chromogenic medium for detection of *Streptococcus***  
27 ***agalactiae* intramammary infection**

28

29 Lára Cristina Bastos Juliano<sup>a</sup>, Fausto Ribeiro Fonseca<sup>a</sup>, Miriam de Andrade Pereira<sup>b</sup>,  
30 José Carlos de Figueiredo Pantoja<sup>a</sup>

31 <sup>a</sup>Animal Production and Preventive Veterinary Medicine Department, College of  
32 Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (UNESP),  
33 Botucatu, Sao Paulo, Brazil, 18618-681.

34 [lara.bastos@unesp.br](mailto:lara.bastos@unesp.br), [fausto.fonseca@unesp.br](mailto:fausto.fonseca@unesp.br), [jose.pantoja@unesp.br](mailto:jose.pantoja@unesp.br).

35 <sup>b</sup>Vale do Rio Verde University Center (UNINCOR), Três Corações, Minas Gerais,  
36 Brazil, 37417-150.

37 [map\\_vet@hotmail.com](mailto:map_vet@hotmail.com).

38

39 <sup>1</sup>Corresponding author: [jose.pantoja@unesp.br](mailto:jose.pantoja@unesp.br)

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

## 51    **ABSTRACT**

52

53    The objectives of this study were to evaluate the accuracy of a chromogenic medium  
 54    (OnFarm, Piracicaba, SP, Brazil) for detection of intramammary infection (IMI) caused  
 55    by *Streptococcus agalactiae* using quarter and composite milk samples and to calculate  
 56    the Kappa's coefficient of concordance between readers (final diagnosis and color  
 57    reading). Four herds in MG were visited once to collect milk samples from mammary  
 58    quarters of all lactating cows (N = 117). Quarter and composite samples (produced in  
 59    the laboratory) were plated on the chromogenic medium. Simultaneously, quarter  
 60    samples were plated on blood agar and the catalase-negative cocci isolates were sent for  
 61    identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass  
 62    Spectrometry (MALDI-TOF MS). Three thresholds were used to estimate the diagnostic  
 63    accuracy parameters of the chromogenic medium: T1) growth of  $\geq 1$  pink colonies, T2)  
 64     $\geq 1$  pink or lilac colonies, and T3)  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies. The Kappa's  
 65    coefficient for the final diagnosis (Kappa = 0.71) and for the color reading (Kappa =  
 66    0.88) were considered as a substantial and almost perfect agreement, respectively. The  
 67    diagnostic accuracy using quarter milk samples based on the three thresholds studied  
 68    was: T1) sensitivity (SE): 44.35%; specificity (SP): 97.81%; positive predictive value  
 69    (PPV): 80.68%, negative predictive value (NPV): 87.62%; T2) SE: 81.05%, SP:  
 70    96.73%, PPV: 83.69%, NPV: 94.62%; T3) SE: 95.08%, SP: 96.30, PPV: 83.60%, NPV:  
 71    98.87%. For composite samples, the accuracy was: T1) SE: 54.05%; PPV: 90.90%;  
 72    NPV: 82.11%; T2) SE: 75.68%, PPV: 93.33%, NPV: 89.65%; T3) SE: 89.19%, PPV:  
 73    94.29%, NPV: 95.12%. The SP (97.50%) remained the same at the three thresholds for  
 74    composite samples. The SE and SP varied among farms: T1) SE: 12.50% - 100.00%,  
 75    SP: 96.47% - 100.00%, T2) SE: 61.54% - 100.00%, SP: 93.55% - 98.99%, T3) SE:

86.67% - 100.00%, SP: 94.71% - 98.99%. The threshold indicated by the manufacturer (T1) resulted in low SE and high proportion of false-negative (FN) results (quarter samples = 55.65%; composite samples = 45.95%), which could increase the dissemination of *S. agalactiae* within the herd. However, there was an improvement in accuracy when T2 and T3 were used.

81

**Keywords:** contagious mastitis, chromogenic plates, streptococci, on-farm milk culturing.

84

**Abbreviations:** CFU: Colonies forming units; CI: Confidence interval; FN: False-negative; FP: False-positive; IMI: Intramammary infection; MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry; NPV: Negative predictive value; PPV: Positive predictive value; SCC: Somatic cell count; SE: Sensitivity; SP: Specificity; T1: Threshold 1; T2: Threshold 2; T3: Threshold 3.

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

## 101    **Introduction**

102            *Streptococcus agalactiae* is a contagious mastitis pathogen that is still prevalent  
 103    in many dairy regions of the world. Regional studies have reported herd-level  
 104    prevalence ranging from 6.8% in Italy (Tamba et al., 2022), 29% in Germany  
 105    (Tenhagen et al., 2006), 33.3% in Norway (Jørgensen et al., 2016), 47% in Colombia  
 106    (Cobo-Ángel et al., 2018), to 40%-60% in Brazil (Brito et al., 1999; Elias et al., 2012).

107            Mammary quarters subclinically infected with *S. agalactiae* produce milk with  
 108    high somatic cell count (SCC) ( $857 \times 10^3$  cells/mL; Djabri et al., 2002), and can shed  
 109     $10^7$  bacteria/mL (Guterbock and Blackmer, 1984), negatively impacting the quality of  
 110    milk and dairy products (Ma et al., 2000). Infected cows also experience decreased milk  
 111    production (1.24 kg/cow/day within three months after diagnosis), as compared to  
 112    healthy cows (Holmøy et al., 2019).

113            Although *S. agalactiae* can spread quickly within the herd, an efficient diagnosis  
 114    and treatment program allows eradication of the pathogen, when supported by adoption  
 115    of management practices, such as proper milking hygiene and removal of chronically  
 116    infected cows (Mahmmod et al., 2015). *Blitz* therapy consists in identification and  
 117    simultaneous treatment of all *S. agalactiae* infected cows in the herd, until eradication is  
 118    achieved.

119            In *Blitz* therapy programs, milk culturing on blood agar has been the reference  
 120    method to diagnose *S. agalactiae* intramammary infection (IMI) for herd screening and  
 121    evaluation of post-treatment bacteriological cure. The sensitivity (SE) and specificity  
 122    (SP) of a single culture have been reported as 95.6% and 99.5% for composite milk  
 123    samples (Rossi et al., 2018), and 98.8% and 100% for quarter milk samples (Dinsmore  
 124    et al., 1991), respectively. However, traditional culturing requires skilled professionals,

125 shipping of samples to a laboratory (2-3 days), and additional 2-3 days until final  
126 diagnosis (Hogan et al., 1999; Ruegg, 2003).

127 As an alternative to speed and simplify the diagnostic process, on-farm milk  
128 culturing with chromogenic media has been increasingly used worldwide. Sensitivity  
129 and SP of 89.1% and 96.3% have been reported for detection of *Streptococcus* spp.  
130 using an on-farm chromogenic medium, although differentiation of *S. agalactiae* from  
131 other streptococci was not possible (Garcia et al., 2021). Development of new media  
132 that can identify *S. agalactiae* with high SE ( $\geq 90\%$ ) and low percentage of false-  
133 negative (FN) results are crucial for more efficient eradication of the pathogen from  
134 dairy herds (Lago et al., 2011).

135 Thus, the objectives of this study were: 1) to evaluate the diagnostic accuracy of  
136 an experimental chromogenic medium for detection of *S. agalactiae* IMI using quarter  
137 and composite milk samples, and 2) to evaluate the agreement between observers to  
138 interpret culture results.

139

## 140 **Materials and methods**

141

### 142 ***Study design***

143 We conducted a cross-sectional study, designed and reported according to the  
144 *Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies* (STARD) (Cohen et al., 2016).

145

### 146 ***Participants and eligibility criteria***

147 A convenience sample of four herds with a history of *S. agalactiae*, located in  
148 Três Corações, Minas Gerais state, Brazil, was used for the study. Lactating cows were

149 eligible for enrollment if they were clinically healthy, had no teat lesions, and had not  
150 received any antimicrobial treatment within 14 days prior to enrollment.

151

### 152 ***Sample collection***

153       Each herd was visited once for sample collection, between August and  
154 December 2021. After the milking technicians performed the pre-milking hygienic  
155 procedures, the teat end was scrubbed with a cotton pad soaked with 70% alcohol, and  
156 the three first milk streams were discarded. Then, quarter milk samples (15 mL) were  
157 aseptically collected in sterile plastic vials. Milk samples were kept refrigerated in  
158 coolers and transported within two hours to the Vale do Rio Verde University's  
159 laboratory, where they were processed within two hours of collection.

160

### 161 ***Test methods***

162       Composite samples were produced in the laboratory by adding 1 mL of each  
163 quarter milk sample into a sterile vial. Following the manufacturer's instructions, the  
164 plates containing the experimental chromogenic medium (OnFarm, Piracicaba, Brazil)  
165 were divided into six equal areas, on which milk was spread with a sterile cotton swab.  
166 Plates were incubated at 36°C and readings were performed at 24 and 48 h. The same  
167 procedure was used to plate quarter and composite milk samples.

168       Simultaneously, quarter milk samples were plated on blood agar according to the  
169 National Mastitis Council's procedures (Hogan et al., 1999). Blood agar plates were  
170 divided into four quadrants and milk was plated with a sterile swab. Plates were  
171 incubated at 36°C for 48 h.

172       Quarter samples were considered positive for bacterial growth on blood agar  
173 when there was growth of  $\geq 3$  similar colonies. A sample was considered contaminated  
174 when there was growth of  $\geq 3$  colony types on the plate. All catalase-negative cocci

isolates were replated onto blood agar and incubated at 36°C for 24 h. Subsequently, these isolates were transported by the authors to the QualiLeite laboratory (University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil) and subjected to MALDI-TOF MS (reference test) (Barcelos et al., 2019) for further speciation. When catalase-negative cocci with different hemolysis patterns were isolated from the same milk sample, both isolates were subjected to MALDI-TOF MS.

For the chromogenic medium, a sample was considered positive for bacterial growth when there was  $\geq 1$  similar colony on the plate. The diagnosis was performed at 24 h and, if there was questionable identification, the diagnosis was confirmed at 48 h. The sample was considered contaminated when  $\geq 3$  colony types grew on the plate.

According to the manufacturer's definition, a *S. agalactiae* positive sample was considered when there was growth of  $\geq 1$  pink colony (Threshold 1 [T1]). Growth of blue colonies was considered as *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp. or *Lactococcus* spp.

Because there was growth of colonies with other colors than pink and blue (Figure 1), two additional thresholds were defined to improve SE and decrease the percentage of FN results: growth of  $\geq 1$  pink or lilac colonies (Threshold 2 [T2]), and growth of  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies on the plate (Threshold 3 [T3]).

To evaluate the agreement between observers to diagnose *S. agalactiae* IMI (yes or no), and to determine the colony's color, two researchers (LCBJ and FRF) read the plates independently and were both masked to MALDI-TOF MS results.

### Statistical analysis

Initially, contingency tables (PROC FREQ; SAS Institute, Cary, NC, USA) were constructed to calculate unadjusted accuracy parameters (SE, SP, positive predictive

value [PPV], negative predictive value [NPV]) and present the respective sample sizes. The accuracy parameters (SE, SP, PPV, NPV) were estimated from logistic regression models (PROC GENMOD; SAS Institute, Cary, NC, USA). The generalized estimating equations method with a compound symmetry covariance structure was used to account for the clustering of quarters within cows (Dohoo et al., 2003).

The Kappa coefficient was used to estimate the agreement between the two observers for diagnosing *S. agalactiae* (yes or no, considering T1), and determining the colony's color (24 h). The analysis was performed at a significance level of 0.05.

### ***Sample size calculation***

The sample size was calculated to estimate the SE and SP of the chromogenic medium, as compared to the reference method (MALDI-TOF MS) (Hajian-Tilaki, 2014). The following assumptions were made for the calculations: expected SE and SP of the chromogenic medium = 0.90; margin of error =  $\pm 0.07$ ; and prevalence of *S. agalactiae* infected quarters = 15%. Thus, 470 mammary quarters (118 cows) from herds confirmed as positive for *S. agalactiae* were required for the study.

## **Results**

### ***Herd characteristics***

The breeds of the 117 included cows were Holstein (63.25%), crossbred (Holstein x Gir; 35.90%) and Jersey (0.85%). Cows were kept in semi-confinement (N = 2), compost barn (N = 1), or pasture (N = 1) systems. Cows were milked in flat barns (N = 3) and pit parlors (N = 1). Herds had a minimum of 15 and a maximum of 215 lactation cows. The herds' total milk production ranged between 50 and 7,000 kg/day.

Bulk tank milk SCC and total bacteria count were available for three herds and ranged from  $500 \times 10^3$  to  $920 \times 10^3$  cells/mL, and  $24 \times 10^3$  to  $90 \times 10^3$  cfu/mL, respectively. The cows' median parity, milk production, and days in milk were 3 lactations, 16 kg/day, and 183 days, respectively.

229

### 230 ***Completeness of the dataset***

231       The flow of missing data is presented in Figure 2. For the final analysis, there  
232       were 461 quarter milk samples and 117 composite milk samples for the index test, and  
233       445 quarter milk samples for the reference test (Figure 2).

234

### 235 ***Agreement between observers for reading culture results (chromogenic medium)***

236       The agreement between observers was substantial for the final diagnosis of *S.*  
237       *agalactiae* (yes or no) (Kappa = 0.71; 95% CI: 0.59 - 0.83), and almost perfect for  
238       determining the colony colors (Kappa = 0.88; 95% CI: 0.84 - 0.93).

239

### 240 ***Distribution of MALDI-TOF MS (reference method) results***

241       The quarter- and cow-level prevalence of *S. agalactiae* was 18.43% (82/445)  
242       and 31.62% (37/117), respectively. Of the 100 isolates that were phenotypically  
243       diagnosed as catalase-negative cocci from blood agar plates, 82 were confirmed as *S.*  
244       *agalactiae* by MALDI-TOF MS (Table 1). Four samples couldn't be identified because  
245       there were not within the MALDI-TOF MS database. Catalase-negative cocci other than  
246       *S. agalactiae* were: *Streptococcus uberis* (3/100), *Streptococcus dysgalactiae* (2/100),  
247       and *Lactococcus lactis* (2/100) (Table 1).

248

249

250 ***Time interval between index test and reference standard***

251 The final diagnostic for both the index (chromogenic medium) and the reference  
252 standard (blood agar) was performed at 48 hs.

253

254 ***Test accuracy***

255 The cross tabulations between the index and reference standard including the  
256 sample size used to estimate the accuracy parameters studied are presented in Table 2.

257 The chromogenic medium's accuracy parameters (SE, SP, PPV, PNV, false-positive  
258 (FP), and FN) for quarter and composite samples are presented in Table 3.

259 The quarter-level apparent prevalence of *S. agalactiae* based on the three  
260 thresholds studied were: T1 = 18.87% (87/461); T2 = 25.81% (119/461) and T3 =  
261 29.72% (137/461). The cow-level (composite samples) apparent prevalence of *S.*  
262 *agalactiae* based on the three thresholds studied were: T1 = 18.80% (22/117); T2 =  
263 25.64% (30/117) and T3 = 29.91% (35/117).

264

265 ***Diagnostic accuracy of the chromogenic medium (index test) at the quarter level***

266 Despite the high SP of 97.81%, adoption of T1 (manufacturer's threshold)  
267 resulted in low SE (44.35%) and high percentage of FN results (55.65%) (Table 3).  
268 Based on T2, the SP was 96.73% and the SE increased to 81.05%, resulting in 18.95%  
269 of FN results (Table 3). Use of T3 maximized SE (95.08%) and minimized the  
270 percentage of FN results (4.92%), as compared to the other thresholds. The SP in T3  
271 remained high (96.30%) (Table 3). Among all thresholds, PPV and NPV ranged  
272 between 80.68% - 83.69% and 87.62% - 98.87%, respectively (Table 3).

273

274

275 ***Diagnostic accuracy of the chromogenic medium (index test) at the cow level***

276 For the composite milk samples, adoption of the manufacturer's definition (T1)  
 277 resulted in low SE (54.05%) and high proportion of FN results (45.95%) (Table 3). At  
 278 T2 and T3, the SE increased to 75.68% and 89.19%, respectively (Table 3). The SP  
 279 remained the same for all thresholds (97.50%) and the PPV and NPV ranged between  
 280 90.90% - 94.29%, and 82.11 - 95.12%, respectively (Table 3).

281

282 ***Prevalence and accuracy parameters by farm***

283 The prevalence of *S. agalactiae* by farm was: A) 8.11%, B) 5.97%, C) 19.51%,  
 284 and D) 55.71% (Table 4). Based on T1, there was substantial variation in SE among the  
 285 farms (12.5% on Farm C to 100% on Farm B). However, for T2 and T3, SE was higher  
 286 and more consistent among the farms (Table 4).

287

288 ***Distribution of colony colors on the chromogenic medium, for Streptococcus***  
 289 ***agalactiae-positive isolates***

290 Of the 82 isolates identified as *S. agalactiae* by the reference standard, most  
 291 (40.24%) corresponded to pink colonies on the chromogenic medium, although 37.80%  
 292 and 17.07% were lilac and purple, respectively (Table 5). Of the 18 catalase-negative  
 293 that were confirmed as species different than *S. agalactiae*, 72.22% corresponded to  
 294 growth of blue colonies on the chromogenic medium.

295 We observed a considerable number of colonies that changed color from 24 to  
 296 48 h. Of the 39 samples that had pink colonies at 24 h, only 28 remained pink at 48 h  
 297 (Table 6).

298

299

## 300 Discussion

301 The main objective of this study was to evaluate the accuracy of an  
 302 experimental, chromogenic medium, to detect SCM caused by *S. agalactiae*. The  
 303 participant farms were close to the research laboratory because we aimed to use  
 304 refrigerated milk samples, to simulate on-farm culture conditions. Performing milk  
 305 cultures on the farms would probably increase the risk of contamination (mostly for  
 306 blood agar cultures), due to lack of proper facilities and environment.

307 Because we sampled the whole herds (except for herd E), the prevalence of *S.*  
 308 *agalactiae* in the study sample agrees with previous studies (Rossi et al., 2018; Dalanezi  
 309 et al., 2020) and likely reflects the prevalence of most infected herds in Brazil. Thus, the  
 310 prevalence-dependent estimates, such as PPV and NPV, could be extrapolated to a large  
 311 population of herds. We observed practices that could contribute to the high prevalence  
 312 of *S. agalactiae*, such as lack of pre-dipping and pos-dipping of teats, and use of a  
 313 shared cloth towels to dry the teats before milking.

314 The “substantial” and “almost perfect” agreement between the two observers to  
 315 diagnose *S. agalactiae* IMI (yes or no), or to determine the colony color, respectively,  
 316 indicates that the plates were easy to read, despite the range of colony colors that were  
 317 observed. Nonetheless, it is important to note that both researchers had previous  
 318 experience in microbiology, which may not apply to most farm personnel.

319 The results of this study provide information that can be used in the field to  
 320 improve the usage of the chromogenic medium. The accuracy parameters were  
 321 estimated based on a reference standard (culture on blood agar followed by MALDI-  
 322 TOF MS) that has been used worldwide to detect *S. agalactiae* and other mastitis  
 323 pathogens (Barreiro et al., 2017; Nonnemann et al., 2019).

Results of our analysis indicate important limitations of the chromogenic medium that need to be addressed to improve its application in screening and *blitz* therapy programs. Use of the manufacturer's threshold (growth of pink colonies on the medium) to define a *S. agalactiae* IIM resulted in insufficient SE. The low SE could be partly explained by the percentage of *S. agalactiae* MALDI-TOF MS-positive isolates that corresponded to growth of colonies with colors other than pink. Furthermore, some colonies changed their colors from 24 to 48 h, which could further complicate the diagnosis. We suggest that, if pink colonies are observed at 24 h, the diagnostic should be confirmed as *S. agalactiae*, regardless of the color at 48 h.

Other factor that might have contributed to the low SE of the medium is the plating area. Although the milk volume was the same for plating on both media (chromogenic medium and on blood agar), we use one-sixth and one-fourth of the plate's surface, respectively. This strategy was used to decrease culture costs, as suggested by the manufacturer. Further studies could test other alternatives to increase SE, such as increasing milk volume and plating area.

To increase SE and minimize the probability of FN results, other thresholds (T2 and T3) were studied. Cows with FN results are *S. agalactiae* reservoirs in the herd who have the potential to quickly transmit IMI to healthy cows (Leelahapongsathon et al., 2016; Tamba et al., 2022). Infected cows will continue to experiment milk production losses and increased SCC (Djabri et al., 2002; Holmøy et al., 2019). For both quarter and composite milk samples, there was a considerable increase in SE by using T3, which agree with previous studies in which chromogenic media were used to detect *Streptococcus* spp (SE = 90.0%, SP = 92.9%; Ganda et al., 2016) and the Gram-positive (GP) media to detect *S. agalactiae*/*S. dysgalactiae* (SE = 89.1%, SP = 96.3%; Garcia et al., 2021).

349           Although it wasn't expected, we did observe substantial variation in the  
350 chromogenic medium's SE among farms. We hypothesize that such finding may have  
351 occurred due to lack of accuracy of some estimates, due to a reduced sample size within  
352 farm, and, possibly, due to genetic differences among herd-specific *S. agalactiae*  
353 isolates, such as serotype. Because this finding might have relevant consequences in the  
354 medium's applicability in the field, we suggest it be further investigated.

355           The little difference in accuracy observed between quarter and composite milk  
356 samples (*e.g.*, SE and SP for quarter and composite samples on T3: 95.08% and  
357 96.30%; 89.19% and 97.50%, respectively) suggests that milk culturing to detect *S.*  
358 *agalactiae* can be performed with the chromogenic medium from composite milk  
359 samples, which could be an alternative to decrease costs and labor. This finding agrees  
360 with previous research (Dinsmore et al., 1991; Rossi et al., 2018) and can be explained  
361 by the high concentration of bacteria in the milk of infected cows (Guterbock and  
362 Blackmer, 1984).

363

#### 364 ***Study limitations***

365           The mainly limitation of this study was that isolates that grew on the  
366 chromogenic medium were not subjected to MALDI-TOF MS identification. However,  
367 the objective of this study was not to validate the chromogenic medium itself, but to test  
368 its accuracy in field conditions. For this purpose, the study was planned to evaluate the  
369 agreement between the results of the index and the reference tests.

370

371

372

373

## 374 **Conclusion**

375           There was substantial and almost perfect agreement between observers to  
376 diagnose *S. agalactiae* IMI (yes or no) or determine colony colors from the  
377 chromogenic medium cultures.

378           The threshold recommended by manufacturer (T1) resulted in low SE and high  
379 probability of FN results, which could compromise the eradication of *S. agalactiae*.  
380 Changing the threshold to T3 increased SE to acceptable levels, and minimized the  
381 probability of FN results, without compromising SP.

382           The use of composite milk samples (T3) did not result in accuracy loss as  
383 compared to using quarter milk samples and could be recommended in herd screening  
384 and blitz therapy programs.

385

## 386 **Ethics approval**

387           This study was approved by the Sao Paulo State University (UNESP) Ethics  
388 Committee for Animal Use (Protocol 0101/2021).

389

## 390 **Funding**

391           This study was conducted with funds from the Mastitis Research and Diagnostic  
392 Laboratory, São Paulo State University (project FUNDUNESP 2258/2014). This study  
393 was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
394 Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

395

## 396 **Declarations of interests**

397           None. OnFarm did not have any participation of influence in the design and  
398 execution of this study.

## 399 Acknowledgments

400 We thank OnFarm (Piracicaba, SP, Brazil) for donating the plates used in this  
401 study. We also thank the farmers who collaborated with the study and allowed us to use  
402 their animals for this research.

403

## 404 References

- 405 Barcelos, M.M., Martins, L., Grenfell, R.C., Juliano, L., Anderson, K.L., Dos Santos,  
406 M.V., Gonçalves, J.L., 2019. Comparison of standard and on-plate extraction  
407 protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. Braz.  
408 J. Microbiol. 50, 849-857. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>.
- 409 Barreiro, J.R., Gonçalves, J.L., Braga, P.A.C., Dibbern, A.G., Eberlin, M.N., Santos,  
410 M.V., 2017. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by  
411 MALDI-TOF mass spectrometry. J. Dairy. Sci. 100, 2928-2934.  
412 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11741>.
- 413 Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Ribeiro, M.T., Veiga, V.M.O., 1999. Padrão de infecção  
414 intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas  
415 em lactação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 51, 129-135.  
416 <https://doi.org/10.1590/S0102-09351999000200001>.
- 417 Cobo-Ángel, C., Jaramillo-Jaramillo, A.S., Lasso-Rojas, L.M., Aguilar-Marin, S.B.,  
418 Sanchez, J., Rodriguez-Lecompte, J.C., Ceballos-Márquez, A., Zadoks, R.N., 2018.  
419 *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen:  
420 molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian  
421 dairy herds. PloS One. 13, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208990>.
- 422 Cohen, J.F., Korevaar, D.A., Altman, D.G., Bruns, D.E., Gatsonis, C.A., Hooft, L.,  
423 Irwig, L., Levine, D., Reitsma, J.B., De Vet, H.C.W., Bossuyt, P.M.M., 2016.

- 424 STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: Explanation and  
425 elaboration. BMJ Open. 6, 1-17. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012799>.
- 426 Dalanezi, F.M., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F., Guerra, S.T., Lopes, B.C., Schmidt,  
427 E.M.S., Cerri, R.L.A., Langoni, H., 2020. Influence of pathogens causing clinical  
428 mastitis on reproductive variables of dairy cows. J. Dairy Sci. 103, 3648-3655.  
429 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841>.
- 430 Deng, Z., Koop, G., Hogeveen, H., Fisher, E.A.J., Van der Borne, B.H.P., Van der Tol,  
431 R., Lam, T.J.G.M., 2021. Transmission dynamics of *Staphylococcus aureus* and  
432 *Streptococcus agalactiae* in a Dutch dairy herd using an automatic milking system.  
433 Prev. Vet. Med. 192, 105384. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105384>.
- 434 Dinsmore, R.P., English, P.B., Gonzalez, R.N., Sears, P.M., Schulte, H.F., 1991.  
435 Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary  
436 infections in dairy cattle. J. Dairy Sci. 74, 1521-1526.  
437 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78312-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78312-4).
- 438 Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., Seegers, H., 2002. Quarter milk somatic cell  
439 count in infected dairy cows: a meta-analysis. Vet. Res. 33, 335-357.  
440 <https://doi.org/10.1051/vetres:2002021>.
- 441 Dohoo, I.R., Martin, W., Stryhn, H., 2003. Logistic regression, in: Veterinary  
442 Epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown, CA, pp. 335-372.
- 443 Elias, A.O., Cortez, A., Brandão, P.E., Silva, R.C., Langoni, H., 2012. Molecular  
444 detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly  
445 from bulk tanks. Res. Vet. Sci. 93, 34-38.  
446 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.016>.
- 447 Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Decter, D.H., Bicalho, R.C., 2016. Evaluation of an on-  
448 farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated

- 449 with clinical mastitis in dairy cows. PloS One. 11, 1-16.  
 450 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155314>.
- 451 Garcia, B.L.N., Fidelis, C.E., Freu, G., Granja, B.M., Santos, M.V., 2021. Evaluation of  
 452 chromogenic culture media for rapid identification of gram-positive bacteria  
 453 causing mastitis. Front. Vet. Sci. 8, 1-11.  
 454 <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.662201>.
- 455 Guterbock, W.M., Blackmer, P.E., 1984. Veterinary interpretation of bulk tank milk.  
 456 Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. 6, 257–268. [https://doi.org/10.1016/](https://doi.org/10.1016/S0196-9846(17)30021-6)  
 457 [S0196-9846\(17\)30021-6](https://doi.org/10.1016/S0196-9846(17)30021-6).
- 458 Hajian-Tilaki, K., 2014. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical  
 459 informatics. J. Biomed. Inform. 48, 193-204.  
 460 <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.02.013>.
- 461 Hogan, J.S., Gonzalez, R.N., Harmon, R.J., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Pankey, J.W.,  
 462 Smith, K.L., 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis  
 463 Council, Madison, US.
- 464 Holmøy, I.H., Toftaker, I., Kirkeby, C., Østerås, O., Jørgensen, H.J., Nødtvedt, A.,  
 465 2019. A cohort study of the effect of *Streptococcus agalactiae* on milk yield and  
 466 somatic cell count in Norwegian dairy cows. J. Dairy Sci. 102, 8385-8399.  
 467 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16155>.
- 468 Jørgensen, H.J., Nordstoga, A.B., Sviland, S., Zadoks, R.N., Sølvørød, L., Kvitle, B.,  
 469 Mørk, T., 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds  
 470 – rewriting the textbooks? Vet. Microbiol. 184, 64-72.  
 471 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.014>.
- 472 Lago, A., Godden, S.M., Bey, R., Ruegg, P.L., Leslie, K., 2011. The selective treatment  
 473 of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use,

- 474 milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. J.  
 475 Dairy Sci. 94, 4441-4456. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4046>.
- 476 Leelahapongsathon, K., Schukken, Y.H., Pinyopummintr, T., Suriyasathaporn, W.,  
 477 2016. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and  
 478 *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. J. Dairy Sci. 99, 1418-1426.  
 479 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9950>.
- 480 Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., Boor, K.J, 2000. Effects  
 481 of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy  
 482 Sci. 83, 264-274. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74873-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74873-9).
- 483 Mahmmoud, Y., Klaas, I.C., Katholm, J., Lutton, M., Zadoks, R.N., 2015. Molecular  
 484 epidemiology and strain-specific characteristics of *Streptococcus agalactiae* at the  
 485 herd and cow level. J. Dairy Sci. 98, 6913-6924. [https://doi.org/10.3168/jds.2015-](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9397)  
 486 [9397](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9397).
- 487 Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K.A., Klaas, I.C., Pedersen, K.,  
 488 2019. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. J.  
 489 Dairy Sci. 102, 2515-2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.
- 490 Rossi, R.S., Amarante, A.F., Correia, L.B.N., Guerra, S.T., Nobrega, D.B., Latosinski,  
 491 G.S., Rossi, B.F., Rall, V.L.M., Pantoja, J.C.F., 2018. Diagnostic accuracy of  
 492 Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite  
 493 milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. J. Dairy Sci. 101,  
 494 10220-10229. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14753>.
- 495 Ruegg, P.L., 2003. Investigation of mastitis problems on farms. Vet. Clin. North Am.  
 496 Food Anim. Pract. 19, 47-73. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(02\)00078-6](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(02)00078-6).
- 497 Tamba, M., Rocca, R., Prosperi, A., Pupillo, G., Bassi, P., Galletti, G., Martini, E.,  
 498 Santi, A., Casadei, G., Arrigoni, N., 2022. Evaluation of control program against

499       *Streptococcus agalactiae* infection in dairy herds during 2019-2021 in Emilia-  
500       Romagna Region, Northern Italy. Front. Vet. Sci. 9, 1-10.  
501       <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.904527>.  
502       Tenhagen, B.A., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W., 2006. Prevalence of mastitis  
503       pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in  
504       Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89, 2542-2551.  
505       [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72330-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72330-x).  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522

**Table 1.** Microbiological diagnosis by the reference standard, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) of the 100 isolates diagnosed phenotypically identified as catalase-negative cocci.

| <b>MALDI-TOF MS</b>               |              |
|-----------------------------------|--------------|
| <b>identification</b>             | <b>n (%)</b> |
| <i>Brevibacillus agri</i>         | 1 (1.0)      |
| <i>Enterococcus faecium</i>       | 1 (1.0)      |
| <i>Lactococcus lactis</i>         | 2 (2.0)      |
| <i>Serratia marcescens</i>        | 1 (1.0)      |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>   | 82 (82.0)    |
| <i>Streptococcus canis</i>        | 1 (1.0)      |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2 (2.0)      |
| <i>Streptococcus lutetiensis</i>  | 1 (1.0)      |
| <i>Streptococcus pluranimaliu</i> | 1 (1.0)      |
| <i>Streptococcus uberis</i>       | 3 (3.0)      |
| <i>Trueperella pyogenes</i>       | 1 (1.0)      |
| No identification <sup>1</sup>    | 4 (4.0)      |

<sup>1</sup> Isolates that were not identified based on the MALDI-TOF MS's database.

**Table 2.** Cross tabulation between the index test results (chromogenic medium) and the reference standard (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS), by threshold and sample type (quarter or composite milk sample).

| Chromogenic medium                 | MALDI-TOF MS |          |       |
|------------------------------------|--------------|----------|-------|
|                                    | Positive     | Negative | Total |
| Quarter – Threshold 1 <sup>1</sup> |              |          |       |
| Positive                           | 34           | 8        | 42    |
| Negative                           | 48           | 355      | 403   |
| Total                              | 82           | 363      | 445   |
| Quarter – Threshold 2 <sup>2</sup> |              |          |       |
| Positive                           | 64           | 12       | 76    |
| Negative                           | 18           | 351      | 369   |
| Total                              | 82           | 363      | 445   |
| Quarter – Threshold 3 <sup>3</sup> |              |          |       |
| Positive                           | 78           | 13       | 91    |
| Negative                           | 4            | 350      | 354   |
| Total                              | 82           | 363      | 445   |
| Composite – Threshold 1            |              |          |       |
| Positive                           | 20           | 2        | 22    |
| Negative                           | 17           | 78       | 95    |
| Total                              | 37           | 80       | 117   |
| Composite – Threshold 2            |              |          |       |
| Positive                           | 28           | 2        | 30    |
| Negative                           | 9            | 78       | 87    |
| Total                              | 37           | 80       | 117   |
| Composite – Threshold 3            |              |          |       |
| Positive                           | 33           | 2        | 35    |
| Negative                           | 4            | 78       | 82    |
| Total                              | 37           | 80       | 117   |

<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink colony on the plate (manufacturer's definition).

<sup>2</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink or lilac colonies on the plate).

<sup>3</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies on the plate).

**Table 3.** Diagnostic accuracy of the index test (chromogenic medium) to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infection, by threshold and sample type (quarter or composite milk sample). The reference standard was Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).

|                           | Quarter milk samples (N = 461)   |                     |                          |               |                          |               |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
|                           | Threshold 1 <sup>1</sup>         |                     | Threshold 2 <sup>2</sup> |               | Threshold 3 <sup>3</sup> |               |
|                           | %                                | CI <sup>4</sup> 95% | %                        | CI 95%        | %                        | CI 95%        |
| Sensitivity               | 44.35                            | 30.85 - 58.74       | 81.05                    | 67.58 - 89.77 | 95.08                    | 87.54 - 98.15 |
| Specificity               | 97.81                            | 95.73 - 98.89       | 96.73                    | 94.39 - 98.12 | 96.30                    | 93.55 - 97.91 |
| False-negative            | 55.65                            | 41.26 - 69.15       | 18.95                    | 10.23 - 32.42 | 4.92                     | 1.85 - 12.46  |
| False-positive            | 2.19                             | 1.11 - 4.28         | 3.27                     | 1.89 - 5.61   | 3.70                     | 2.09 - 6.45   |
| Positive predictive value | 80.68                            | 65.68 - 90.11       | 83.69                    | 73.17 - 90.61 | 83.60                    | 72.67 - 90.71 |
| Negative predictive value | 87.62                            | 81.60 - 91.86       | 94.62                    | 89.39 - 97.35 | 98.87                    | 97.04 - 99.58 |
|                           | Composite milk samples (N = 117) |                     |                          |               |                          |               |
|                           | Threshold 1                      |                     | Threshold 2              |               | Threshold 3              |               |
|                           | %                                | 95% CI              | %                        | 95% CI        | %                        | 95% CI        |
| Sensitivity               | 54.05                            | 38.13 - 69.19       | 75.68                    | 59.48 - 86.83 | 89.19                    | 74.51 - 95.88 |
| Specificity               | 97.50                            | 90.55 - 99.37       | 97.50                    | 90.55 - 99.37 | 97.50                    | 90.55 - 99.37 |
| False-negative            | 45.95                            | 30.81 - 61.87       | 24.32                    | 13.17 - 40.52 | 10.81                    | 4.12 - 25.49  |
| False-positive            | 2.50                             | 0.63 - 9.45         | 2.50                     | 0.63 - 9.45   | 2.50                     | 0.63 - 9.45   |
| Positive predictive value | 90.90                            | 70.04 - 97.72       | 93.33                    | 76.93 - 98.33 | 94.29                    | 79.84 - 98.57 |
| Negative predictive value | 82.11                            | 73.08 - 88.58       | 89.65                    | 81.30 - 94.53 | 95.12                    | 87.71 - 98.16 |

<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae* intramammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink colony on the plate (manufacturer's definition).

<sup>2</sup> *Streptococcus agalactiae* intramammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink or lilac colonies on the plate).

<sup>3</sup> *Streptococcus agalactiae* intramammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies on the plate).

<sup>4</sup> 95% confidence interval.

**Table 4.** Prevalence and diagnostic accuracy parameters of the chromogenic medium (index test) to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infection from quarter milk samples, by farm.

| Farm | Prevalence      | Threshold 1 <sup>1</sup> |                     | Threshold 2 <sup>2</sup> |        | Threshold 3 <sup>3</sup> |        |
|------|-----------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
|      |                 | SE <sup>4</sup> (%)      | SP <sup>5</sup> (%) | SE (%)                   | SP (%) | SE (%)                   | SP (%) |
| A    | 55.71% (39/70)  | 35.90                    | 100.00              | 61.54                    | 93.55  | 97.44                    | 93.55  |
| B    | 5.97% (4/67)    | 100.00                   | 98.41               | 100.00                   | 98.41  | 100.00                   | 98.41  |
| C    | 19.51% (24/123) | 12.50                    | 98.99               | 95.83                    | 98.99  | 95.83                    | 98.99  |
| D    | 8.11% (15/185)  | 86.67                    | 96.47               | 86.67                    | 95.29  | 86.67                    | 94.71  |

<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink colony on the plate (manufacturer's definition).

<sup>2</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink or lilac colonies on the plate).

<sup>3</sup> *Streptococcus agalactiae* intrammary infection defined as growth of  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies on the plate).

<sup>4</sup> Sensitivity.

<sup>5</sup> Specificity.

**Table 5.** Association between the observed colony colors on the chromogenic medium (index test) and the results of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS - reference standard) in quarter and composite milk samples.

| Colony color | Quarter milk samples            |                                 |       | Composite milk samples |                    |       |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|------------------------|--------------------|-------|
|              | MALDI-TOF positive <sup>1</sup> | MALDI-TOF negative <sup>2</sup> | Total | MALDI-TOF positive     | MALDI-TOF negative | Total |
| Blue         | 1 (1.22%) <sup>3</sup>          | 13 (3.58%)                      | 14    | 3 (8.11%)              | 2 (2.50%)          | 5     |
| Lilac        | 31 (37.80%)                     | 2 (0.55%)                       | 33    | 8 (21.62%)             | 0 (0.00%)          | 8     |
| Pink         | 33 (40.24%)                     | 3 (0.83%)                       | 36    | 19 (51.35%)            | 1 (1.25%)          | 20    |
| Purple       | 14 (17.07%)                     | 0 (0.00%)                       | 14    | 5 (13.51%)             | 0 (0.00%)          | 5     |
| Negative     | 3 (3.66%)                       | 345 (95.04%)                    | 348   | 2 (5.41%)              | 77 (96.25%)        | 79    |
| Total        | 82 (100.00%)                    | 363 (100.00%)                   | 445   | 37 (100.00%)           | 80 (100.00%)       | 117   |

<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae* MALDI-TOF MS positive isolates.

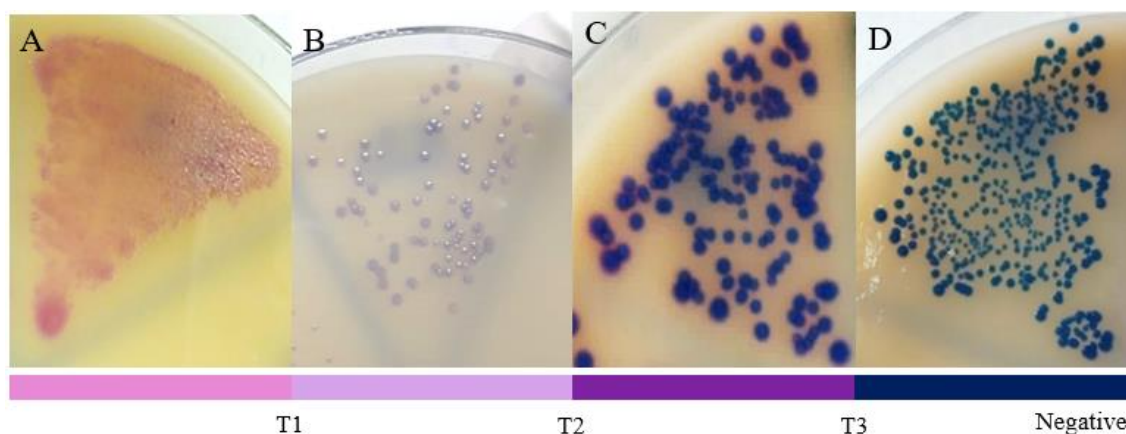
<sup>2</sup> *Streptococcus agalactiae* MALDI-TOF MS negative isolates.

<sup>3</sup> Percentage of the column's total.

**Table 6.** Changes in colony color between 24 and 48 h after milk culturing on the index test (chromogenic medium).

| Color        | Quarter milk samples    |               | Composite milk samples |               |
|--------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|
|              | 24 h                    | 48 h          | 24 h                   | 48 h          |
| Blue         | 14 (3.04%) <sup>1</sup> | 61 (13.23%)   | 5 (4.27%)              | 16 (13.68%)   |
| Lilac        | 33 (7.16%)              | 4 (0.87%)     | 8 (6.84%)              | 2 (1.71%)     |
| Pink         | 39 (8.46%)              | 28 (6.07%)    | 20 (17.09%)            | 12 (10.26%)   |
| Purple       | 14 (3.04%)              | 28 (6.07%)    | 5 (4.27%)              | 10 (8.55)     |
| Contaminated | -                       | 2 (0.43%)     | -                      | -             |
| Other        | -                       | 7 (1.53%)     | -                      | -             |
| Negative     | 361 (78.31%)            | 331 (71.80%)  | 79 (67.52%)            | 77 (65.81%)   |
| Total        | 461 (100.00%)           | 461 (100.00%) | 117 (100.00%)          | 117 (100.00%) |

<sup>1</sup> Percentage of the column's total.



646

647 **Figure 1.** Colony colors considered to define the thresholds used to define a648 *Streptococcus agalactiae* intramammary infection. A: pink; B: lilac, C: purple, and D:649 blue colonies. Threshold 1: growth of  $\geq 1$  pink colony on the plate (manufacturer's650 definition); Threshold 2: growth of  $\geq 1$  pink or lilac colonies on the plate; Threshold 3:651 growth of  $\geq 1$  pink, lilac, or purple colonies on the plate. Blue colonies were considered652 as negative for *S. agalactiae* and positive for *Streptococcus uberis*, *Lactococcus* spp., or653 *Enterococcus* spp.

654

655

656

657

658

659

660

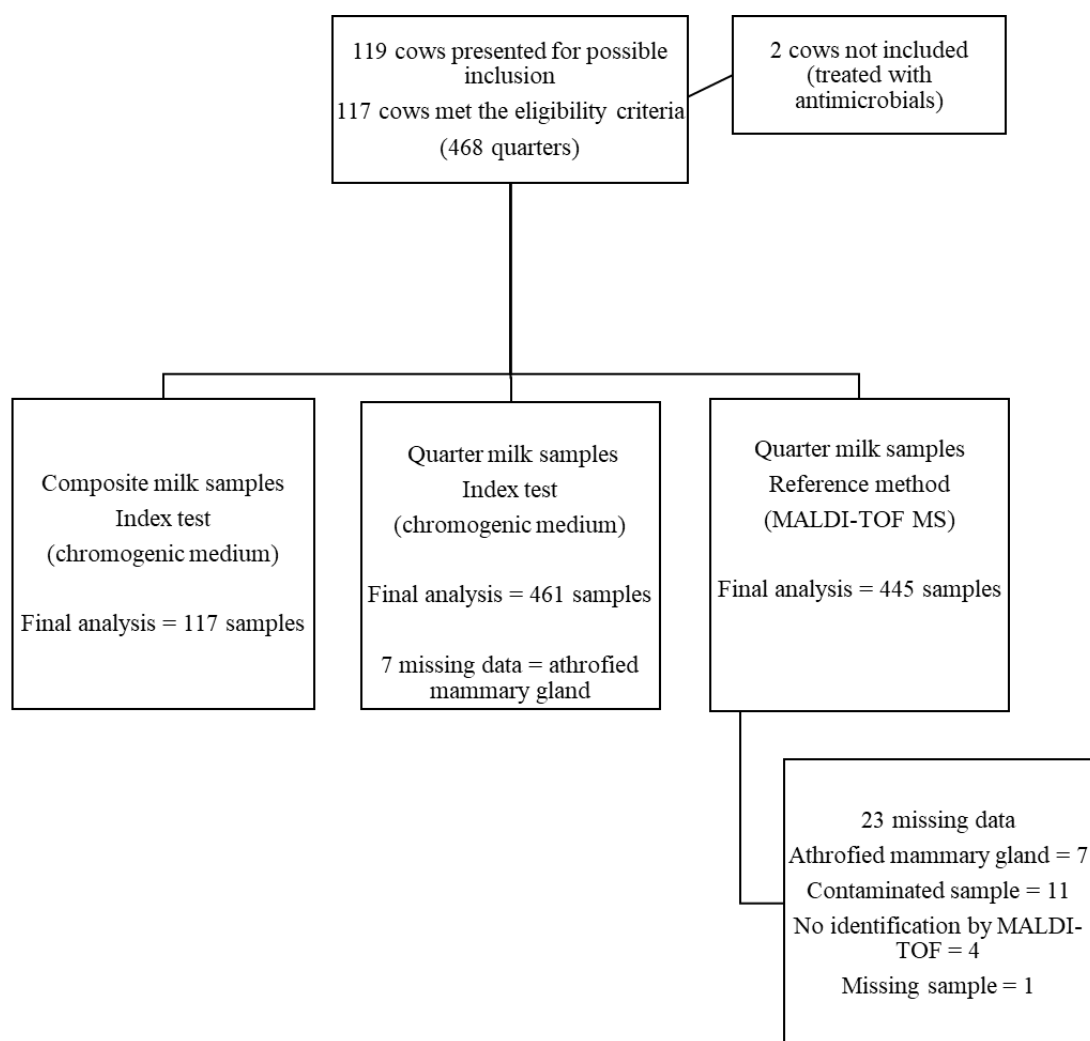
661

662

663

664

665



666

667

668 **Figure 2.** Completeness of the dataset used to evaluate the diagnostic accuracy of the  
 669 chromogenic medium, to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infection. The  
 670 reference standard was Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight  
 671 Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).

672

673

674

675

676

## 677 **CAPÍTULO 3**

678

### 679 **DISCUSSÃO GERAL**

680 O principal objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia de um meio cromogênico  
681 experimental para detecção de IIM causada por *S. agalactiae*. As fazendas participantes  
682 ficavam próximas ao laboratório de pesquisa pois nosso objetivo era usar amostras de  
683 leite refrigerado, simulando as condições de cultivo na fazenda. A realização de culturas  
684 de leite nas fazendas provavelmente aumentaria o risco de contaminação (principalmente  
685 para culturas de ágar sangue), devido à falta de instalações e ambiente adequados.

686 Como amostramos todos os rebanhos (exceto o rebanho E), a prevalência de *S.*  
687 *agalactiae* na amostra do estudo concorda com estudos anteriores (ROSSI *et al.*, 2018;  
688 DALANEZI *et al.*, 2020) e provavelmente reflete a prevalência da maioria dos rebanhos  
689 infectados no Brasil. Assim, as estimativas dependentes da prevalência (VPP e VPN)  
690 podem ser extrapoladas para uma grande população de rebanhos.

691 A concordância “substancial” e “quase perfeita” entre os dois observadores para  
692 diagnosticar IIM por *S. agalactiae* (sim ou não), ou para determinar a cor da colônia,  
693 respectivamente, indica que as placas eram fáceis de ler, apesar da variedade de cores das  
694 colônias que foram observadas.

695 Os resultados deste estudo fornecem informações que podem ser usadas a campo  
696 para melhorar o uso do meio cromogênico. Os parâmetros de acurácia foram estimados  
697 com base em um método de referência (cultura em ágar sangue seguido de MALDI-TOF  
698 MS) que tem sido amplamente utilizado para detectar *S. agalactiae* e outros patógenos da  
699 mastite (BARREIRO *et al.*, 2017; NONNEMANN *et al.*, 2019).

700 Os resultados de nossa análise indicam limitações importantes do meio  
701 cromogênico que precisam ser abordadas para melhorar sua aplicação em programas de  
702 triagem e *blitz* terapia. O uso recomendado pelo fabricante (crescimento de colônias rosa  
703 no meio) para definir uma IIM por *S. agalactiae* resultou em SE insuficiente. O que pode  
704 ser parcialmente explicado pela porcentagem de isolados positivos de *S. agalactiae* no  
705 MALDI-TOF MS que corresponderam ao crescimento de colônias com cores diferentes  
706 do rosa. Além disso, algumas colônias mudaram de cor entre 24 e 48 horas, o que pode  
707 comprometer ainda mais o diagnóstico.

708 Outro fator que pode ter contribuído para a baixa SE do meio é a área de  
709 plaqueamento. Embora o volume de leite tenha sido o mesmo para o plaqueamento em  
710 ambos os meios (meio cromogênico e ágar sangue), utilizamos um sexto e um quarto da

711 superfície da placa, respectivamente. Essa estratégia foi utilizada para diminuir os custos  
712 da cultura, conforme sugerido pelo fabricante.

713         Para aumentar a SE e minimizar a proporção de resultados de FN, outros pontos  
714 de corte (PC2 e PC3) foram estudados. Vacas FN são reservatórios de *S. agalactiae* no  
715 rebanho e têm o potencial de transmitir rapidamente para vacas saudáveis  
716 (LEELAHAPONGSATHON *et al.*, 2016; TAMBA *et al.*, 2022). As vacas infectadas  
717 continuarão experimentando perdas na produção de leite e aumento da CCS (DJABRI *et*  
718 *al.*, 2002; HOLMØY *et al.*, 2019). Para as amostras de leite compostas e de um quarto,  
719 houve um aumento considerável na SE usando PC3, o que concorda com estudos  
720 anteriores nos quais um meio cromogênico foi utilizado para detectar *Streptococcus* spp  
721 (SE = 90,0%, SP = 92,9%; GANDA *et al.*, 2016) e o meio *Gram-positive* (GP) para  
722 detectar *S. agalactiae*/*S. dysgalactiae* (SE = 89,1%, SP = 96,3%; GARCIA *et al.*, 2021).

723         Embora não fosse esperado, observamos variação substancial na SE do meio  
724 cromogênico entre as fazendas. Nossa hipótese é que a falta de precisão de algumas  
725 estimativas ocorreu devido a um tamanho amostral reduzido dentro da fazenda e,  
726 possivelmente, devido a diferenças genéticas entre isolados de *S. agalactiae* específicos  
727 do rebanho, como o sorotipo.

728         A pequena diferença na precisão observada entre amostras de leite de um quarto  
729 e compostas (por exemplo, SE e ES para amostras de quarto e compostas em PC3: 95,08%  
730 e 96,30%; 89,19% e 97,50%, respectivamente) sugere que a cultura do leite para detectar  
731 *S. agalactiae* pode ser realizada no meio cromogênico com amostras compostas de leite,  
732 o que pode ser uma alternativa para diminuir custos e mão de obra. Esse achado concorda  
733 com pesquisas anteriores (DINSMORE *et al.*, 1991; ROSSI *et al.*, 2018) e pode ser  
734 explicado pela alta concentração de bactérias no leite de vacas infectadas  
735 (GUTERBOCK; BLACKMER, 1984).

736         A principal limitação deste estudo foi que os isolados que cresceram no meio  
737 cromogênico não foram submetidos à identificação por MALDI-TOF MS. No entanto, o  
738 objetivo deste estudo não foi validar o meio cromogênico em si, mas testar sua precisão  
739 em condições de campo. Para tanto, planejou-se o estudo para avaliar a concordância  
740 entre os resultados do teste índice e do teste de referência.

741

## 742 CONCLUSÃO GERAL

743 Houve concordância substancial e quase perfeita entre os observadores para  
744 diagnosticar IIM causada por *S. agalactiae* (sim ou não) ou determinar as cores das  
745 colônias das culturas no meio cromogênico.

746 O ponto de corte recomendado pelo fabricante (PC1) resultou em baixa SE e alta  
747 proporção de resultados FN, o que poderia comprometer a erradicação de *S. agalactiae*.  
748 Mudar o ponto de corte para PC3 aumentou a SE para níveis aceitáveis e minimizou a  
749 probabilidade de resultados FN, sem comprometer a ES.

750 O uso de amostras compostas de leite (PC3) não resultou em perda de acurácia em  
751 comparação com o uso de amostras de leite de quarto e pode ser recomendado em  
752 programas de triagem de rebanho e *blitz* terapia.

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775 **REFERÊNCIAS**

776

777 AZEVEDO, C.; PACHECO, D.; SOARES, L.; MOITOSO, M.; MALDONADO, J.;

778 GUIX, R.; SIMÕES, J. Prevalence of bovine milk pathogens in Azorean pastures:

779 mobile versus fixed milking machines. **Veterinary Record Open**, Hoboken, v. 3, n. 1,

780 p. 1-6, 2016. DOI 10.1136/vetreco-2016-000181.

781 BARCELOS, M.M., MARTINS, L., GRENFELL, R.C., JULIANO, L., ANDERSON,

782 K.L., DOS SANTOS, M.V., GONÇALVES, J.L. Comparison of standard and on-plate

783 extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS.

784 **Brazilian Journal of Microbiology**, v.50, p. 849-857, 2019. DOI 10.1007/s42770-019-

785 00110-5.

786 BARREIRO, J.R.; GONÇALVES, J.L.; BRAGA, P.A.C.; DIBBERN, A.G.; EBERLIN,

787 M.N.; SANTOS, M.V. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by

788 MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2928-2934,

789 2017. DOI 10.3168/jds.2016-11741.

790 BENIĆ, M.; MAČEŠIĆ, N.; CVETNIĆ, L.; HABRUN, B.; CVETNIĆ, Ž.; TURK, R.;

791 ĐURIČIĆ, D.; LOJKIĆ, M.; DOBRANIĆ, V.; VALPOTIĆ, H.; GRIZELJ, J.;

792 GRAČNER, D.; GRBAVAC, J.; SAMARDŽIJA, M. Bovine mastitis: a persistent and

793 evolving problem requiring novel approaches for its control - a review. **Veterinarski**794 **Arhiv**, Zagreb, v. 88, n. 4, p. 535-557, 2018. DOI 10.24099/vet.arhiv.0116.

795 BI, Y.; WANG, Y. J.; QIN, Y.; VALLVERDÚ, R. G.; GARCÍA, J. M.; SUN, W.; LI,

796 S.; CAO, Z. Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. **PLoS**797 **ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1-13, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0155621.

798 BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de

799 infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das

800 vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo

801 Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999. DOI 10.1590/S0102-09351999000200001.

802 CAI, H.Y.; ARCHAMBAULT, M.; GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. Molecular genetic

803 methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future

804 applications. **Animal Health Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 73-93, 2003. DOI

805 10.1079/AHRR200359.

- 806 CHURAKOV, M.; KATHOLM, J.; ROGERS, S.; KAO, R. R.; ZADOKS, R. N.  
 807 Assessing potential routes of *Streptococcus agalactiae* transmission between dairy  
 808 herds using national surveillance, animal movement data and molecular typing.  
 809 **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 197, p. 105501, 2021. DOI  
 810 10.1016/j.prevetmed.2021.105501.
- 811 COBO-ÁNGEL, C.; JARAMILLO-JARAMILLO, A. S.; LASSO-ROJAS, L. M.;  
 812 AGUILAR-MARIN, S. B.; SANCHEZ, J.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C.;  
 813 CEBALLOS-MÁRQUEZ, A.; ZADOKS, R. N. *Streptococcus agalactiae* is not always  
 814 an obligate intramammary pathogen: molecular epidemiology of GBS from milk, feces  
 815 and environment in Colombian dairy herds. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 12, p.  
 816 1-14, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0208990.
- 817 COHEN, J.F.; KOREVAAR, D.A.; ALTMAN, D.G.; BRUNS, D.E.; GATSONIS,  
 818 C.A.; HOOFT, L.; IRWIG, L.; LEVINE, D.; REITSMA, J.B.; DE VET, H.C.W.;  
 819 BOSSUYT, P.M.M. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies:  
 820 Explanation and elaboration. **BMJ Open**, v. 6, p. 1-17, 2016. DOI 10.1136/bmjopen-  
 821 2016-012799.
- 822 CRESTANI, C.; FORDE, T. L.; LYCETT, S. J.; HOLMES, M. A.; FASTH, C.;  
 823 PERSSON-WALLER, K.; ZADOKS, R. N. The fall and rise of group b *Streptococcus*  
 824 in dairy cattle: reintroduction due to human-to-cattle host jumps? **Microbial Genomics**,  
 825 London, v. 7, n. 9, 2021. DOI 10.1099/mgen.0.000648.
- 826 DALANEZI, F. M.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F. F.; GUERRA, S. T.; LOPES,  
 827 B. C.; SCHMIDT, E. M. S.; CERRI, R. L. A.; LANGONI, H. Influence of pathogens  
 828 causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy**  
 829 **Science**, Champaign, v. 103, n. 4, p. 3648-3655, 2020. DOI 10.3168/jds.2019-16841.
- 830 DEMIL, E.; TESHOME, L.; KERIE, Y.; HABTAMU, A.; KUMILACHEW, W.;  
 831 ANDUALEM, T.; MEKONNEN, S. A. Prevalence of subclinical mastitis, associated  
 832 risk factors and antimicrobial susceptibility of the pathogens isolated from milk samples  
 833 of dairy cows in Northwest Ethiopia. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.  
 834 205, p. 105680, 2022. DOI 10.1016/j.prevetmed.2022.105680.
- 835 DENG, Z.; KOOP, G.; HOGEVEEN, H.; FISCHER, E. A. J.; VAN DEN BORNE, B.  
 836 H. P.; VAN DER TOL, R.; LAM, T. J. G. M. Transmission dynamics of

- 837 *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in a Dutch dairy herd using an  
838 automatic milking system. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 192, p.  
839 105384, 2021. DOI 10.1016/j.prevetmed.2021.105384.
- 840 DINSMORE, R. P.; ENGLISH, P. B.; GONZALEZ, R. N.; SEARS, P. M.; SCHULTE,  
841 H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*  
842 intramammary infections in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74,  
843 n. 5, p. 1521-1526, 1991. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(91)78312-4.
- 844 DOHOO, I. R., MARTIN, W., STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research:  
845 Logistic regression**. Charlottetown, CA: AVC Inc. 2003.
- 846 DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine  
847 mastitis diagnosis: an overview. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**,  
848 Thousand Oaks, v. 27, n. 6, p. 665-672, 2015. DOI 10.1177/1040638715603087.
- 849 DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H. Quarter milk somatic  
850 cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4,  
851 p.335-357, 2002. DOI 10.1051/vetres:2002021.
- 852 EDMONDSON, P. An economic justification of “blitz” therapy to eradicate  
853 *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 24, p.  
854 591-593, 1989. PMID 2514481.
- 855 EDMONDSON, P. Blitz therapy for the eradication of *Streptococcus agalactiae*  
856 infections in dairy cattle. **In Practice**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 33-37, 2011. DOI  
857 10.1136/inp.c7449.
- 858 ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDÃO, P. E.; SILVA, R. C.; LANGONI, H.  
859 Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained  
860 directly from bulk tanks. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 1, p. 34-  
861 38, 2012. DOI 10.1016/j.rvsc.2011.07.016.
- 862 ERSKINE, R. J.; EBERHART, R. J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine  
863 mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*.  
864 **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 8,  
865 p. 1230-1235, 1990.

- 866 ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and  
867 pharmacology. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**,  
868 Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003. DOI 10.1016/S0749-0720(02)00067-1.
- 869 FALLON, R. J. The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci.  
870 **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 27, n. 11, p. 902-905, 1974. DOI  
871 10.1136/jcp.27.11.902.
- 872 FARNSWORTH, R.; STEWART, S.; REID, D. F-MC-2: dealing with *Streptococcus*  
873 *agalactiae* mastitis. **Quality Counts**, Minneapolis, p. 1-5, 2003.
- 874 FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious mastitis. **Veterinary Clinics of North America.**  
875 **Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 475-487, 1993. DOI 10.1016/S0749-  
876 0720(15)30615-0.
- 877 GANDA, E. K.; BISINOTTO, R. S.; DECTER, D. H.; BICALHO, R. C. Evaluation of  
878 an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens  
879 associated with clinical mastitis in dairy cows. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5,  
880 p. 1-16, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0155314.
- 881 GARCIA, B. L. N.; FIDELIS, C. E.; FREU, G.; GRANJA, B. M.; SANTOS, M. V.  
882 Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of gram-positive  
883 bacteria causing mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, p. 1-11,  
884 2021. DOI 10.3389/fvets.2021.662201.
- 885 GUARÍN, J.F.; PAIXÃO, M.G.; RUEGG, P.L. Association of anatomical  
886 characteristics of teats with quarter-level somatic cell count. **Journal of Dairy Science**,  
887 v. 100, n. 1, p. 643-652, 2017. DOI 10.3168/jds.2016-11459.
- 888 GUTERBOCK, W.M.; BLACKMER, P.E. Veterinary interpretation of bulk tank milk.  
889 **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v. 6, p. 257-268,  
890 1984. DOI 10.1016/S0196-9846(17)30021-6.
- 891 HAJIAN-TILAKI, K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical  
892 informatics. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 48, p. 193-204, 2014.
- 893 HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of  
894 bovine mastitis and mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, Abingdon,  
895 v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007. DOI 10.1080/01652176.2007.9695224.

- 896 HIITIO, H.; VAKKAMAKI, J.; SIMOJOKI, H.; AUTIO, T.; JUNNILA, J.;  
 897 PELKONEN, S.; PYORALA, S. Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy  
 898 cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. **Acta**  
 899 **Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 22, 2017. DOI 10.1186/s13028-017-0288-x.
- 900 HOGAN, J. S.; GONZALEZ, R. N.; HARMON, R. J.; NICKERSON, S. C; OLIVER,  
 901 S. P.; PANKEY, J. W.; SMITH, K. L. **Laboratory handbook on bovine mastitis**.  
 902 Madison: National Mastitis Council, 1999. 222 p.
- 903 HOGEVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new  
 904 developments. **New Zealand Veterinary Journal**, Abingdon, v. 59, n. 1, p. 16-23,  
 905 2011. DOI 10.1080/00480169.2011.547165.
- 906 HOLMØY, I. H.; TOFTAKER, I.; KIRKEBY, C.; ØSTERÅS, O.; JØRGENSEN, H. J.;  
 907 NØDTVEDT, A. A cohort study of the effect of *Streptococcus agalactiae* on milk yield  
 908 and somatic cell count in Norwegian dairy cows. **Journal of Dairy Science**,  
 909 Champaign, v. 102, n. 9, p. 8385-8399, 2019. DOI 10.3168/jds.2018-16155.
- 910 JØRGENSEN, H. J.; NORDSTOGA, A. B.; SVILAND, S.; ZADOKS, R. N.;  
 911 SØLVERØD, L.; KVITILE, B.; MØRK, T. *Streptococcus agalactiae* in the environment  
 912 of bovine d-iry herds - rewriting the textbooks? **Veterinary Microbiology**,  
 913 Amsterdam, v. 184, p. 64-72, 2016. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.12.014.
- 914 KABELITZ, T.; AUBRY, E.; VAN VORST, K.; AMON, T.; FULDE, M. The role of  
 915 *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. **Microorganisms**, Basel, v. 9, n. 7, p. 1-21, 2021.  
 916 DOI 10.3390/microorganisms9071497.
- 917 KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*  
 918 for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal**  
 919 **Practice**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.03.010.
- 920 LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective  
 921 treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic  
 922 use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes.  
 923 **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011. DOI  
 924 10.3168/jds.2010-4046.
- 925 LEELAHAPONGSATHON, K.; SCHUKKEN, Y. H.; PINYOPUMMINTR, T.;  
 926 SURIYASATHAPORN, W. Comparison of transmission dynamics between

- 927 *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal**  
 928 **of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 2, p. 1418-1426, 2016. DOI 10.3168/jds.2015-  
 929 9950.
- 930 MA, Y., RYAN, C., BARBANO, D.M., GALTON, D.M., RUDAN, M.A., BOOR, K.J.  
 931 Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal**  
 932 **of Dairy Science**, v.83, p. 264-274, 2000. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(00)74873-9.
- 933 MAHMMOD, Y. The future of PCR technologies in diagnosis of bovine mastitis  
 934 pathogens. **Journal of Advances in Dairy Research**, Los Angeles, v. 2, n. 1, 2013.  
 935 DOI 10.4172/2329-888X.1000e106.
- 936 MAHMMOD, Y.; KLAAS, I.C.; KATHOLM, J.; LUTTON, M.; ZADOKS, R.N.  
 937 Molecular epidemiology and strain-specific characteristics of *Streptococcus agalactiae*  
 938 at the herd and cow level. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6913-6924, 2015.  
 939 DOI 10.3168/jds.2015-9397.
- 940 MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE,  
 941 D. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Edinburgh: Elsevier, 2013. 901 p.
- 942 MARTINEZ, G.; HAREL, J.; HIGGINS, R.; LACOUTURE, S.; DAIGNAULT, D.;  
 943 GOTTSCHALK, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine  
 944 and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of**  
 945 **Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 71-78, 2000. DOI  
 946 10.1128/jcm.38.1.71-78.2000.
- 947 MWEU, M. M.; NIELSEN, S. S.; HALASA, T.; TOFT, N. Annual incidence,  
 948 prevalence and transmission characteristics of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy  
 949 herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 106, n. 3-4, p. 244-250, 2012.  
 950 DOI 10.1016/j.prevetmed.2012.04.002.
- 951 NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G.; WESTGARTH, D. R. Control of  
 952 mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**,  
 953 Champaign, v. 52, n. 5, p. 696-707, 1969. DOI 10.3168/jds.s0022-0302(69)86632-4.
- 954 NATIONAL MASTITIS COUNCIL. A practical look at contagious mastitis.  
 955 Disponível em: <<https://www.nmconline.org/fact-sheets/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

- 956 NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K. A.; KLAAS, I.  
 957 C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass  
 958 spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 3, p. 2515-2524, 2019.  
 959 DOI 10.3168/jds.2018-15424.
- 960 PAL, M.; REGASA, A.; GIZAW, F. Etiology, pathogenesis, risk factors, diagnosis and  
 961 management of bovine mastitis: a comprehensive review. **International Journal of**  
 962 **Animal and Veterinary Sciences**, v. 6, p. 40-55, 2019.
- 963 PANG, M.; SUN, L.; HE, T.; BAO, H.; ZHANG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; WEI, R.;  
 964 LIU, Y.; WANG, R. Molecular and virulence characterization of highly prevalent  
 965 *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. **Veterinary Research**,  
 966 London, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI 10.1186/s13567-017-0461-2.
- 967 REYES, J.; CHAFFER, M.; SANCHEZ, J.; TORRES, G.; MACIAS, D.; JARAMILLO,  
 968 M.; DUQUE, P.C.; CEBALLOS, A.; KEEFE, G.P. Evaluation of the efficacy of  
 969 intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae*  
 970 mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5294-  
 971 5303, 2015. DOI 10.3168/jds.2014-9199.
- 972 ROSSI, R. S.; AMARANTE, A. F.; CORREIA, L. B. N.; GUERRA, S. T.; NOBREGA,  
 973 D. B.; LATOSINSKI, G. S.; ROSSI, B. F.; RALL, V. L. M.; PANTOJA, J. C. F.  
 974 Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological  
 975 examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary  
 976 infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 11, p. 10220-10229, 2018.  
 977 DOI 10.3168/jds.2018-14753.
- 978 ROSSI, R.S.; AMARANTE, A.F.; GUERRA, S.T.; LATOSINSKI, G.S.; ROSSI, B.F.;  
 979 RALL, V.L.M.; PANTOJA, J.C.F. Efficacy of cefquinome and a combination of  
 980 cloxacillin and ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus agalactiae*  
 981 subclinical mastitis. **PLoS ONE**, v.14, n.4, 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0216091.
- 982 RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics of**  
 983 **North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 47-73, 2003. DOI  
 984 10.1016/S0749-0720(02)00078-6.

- 985 RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention.  
 986 **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017. DOI  
 987 10.3168/jds.2017-13023.
- 988 SEALE, A. C.; BIANCHI-JASSIR, F.; RUSSELL, N. J.; KOHLI-LYNCH, M.; TANN,  
 989 C. J.; HALL, J.; MADRID, L.; BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; BAKER, C. J.;  
 990 BARTLETT, L.; CUTLAND, C.; GRAVETT, M. G.; HEATH, P. T.; IP, M.; LE  
 991 DOARE, K.; MADHI, S. A.; RUBENS, C. E.; SAHA, S. K.; SCHRAG, S. J.;  
 992 MEULEN, A. S. T.; VEKEMANS, J.; LAWN, J. E. Estimates of the burden of group B  
 993 streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. **Clinical**  
 994 **Infectious Diseases**, Oxford, v. 65, n. 2, p. S200-S219, 2017.
- 995 SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K.; VIRDI, J.S. MALDI-TOF mass  
 996 spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis.  
 997 **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 791, p. 1-16, DOI 10.3389/fmicb.2015.00791.
- 998 TAMBA, M.; ROCCA, R.; PROSPERI, A.; PUPILLO, G.; BASSI, P.; GALLETI, G.;  
 999 MARTINI, E.; SANTI, A.; CASADEI, G.; ARRIGONI, N. Evaluation of control  
 1000 program against *Streptococcus agalactiae* infection in dairy herds during 2019–2021 in  
 1001 Emilia-Romagna Region, Northern Italy. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne,  
 1002 v. 9, p. 904527, 2022. DOI 10.3389/fvets.2022.904527.
- 1003 TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of  
 1004 mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in  
 1005 Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2542-  
 1006 2551, 2006. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X.
- 1007 YAMAGATA, M.; GOODGER, W. J.; WEAVER, L.; FRANTI, C. The economic  
 1008 benefits of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows.  
 1009 **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 191, n.  
 1010 12, p. 1556-1561, 1987.
- 1011 ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDUGALL, S.; KATHOLM, J.;  
 1012 SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and  
 1013 comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and**  
 1014 **Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011. DOI 10.1007/s10911-011-9236-y.
- 1015

1016 **ANEXO I** – Normas de publicação da revista *Preventive Veterinary Medicine*  
1017 [https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/503315?generatepdf=t](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503315?generatepdf=true)  
1018 [rue](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503315?generatepdf=true)