

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O AUMENTO DA
EFICÁCIA EM PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO
DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS

RODOLFO SANTOS ROSSI

Botucatu – SP

Abril, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O AUMENTO DA
EFICÁCIA EM PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO
DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS

RODOLFO SANTOS ROSSI

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

Rossi, Rodolfo Santos.

Novas estratégias para o aumento da eficácia em programas de erradicação de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos leiteiros / Rodolfo Santos Rossi. - Botucatu, 2017

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

Orientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja
Capes: 50502018

1. Bovino de leite - Doenças. 2. Mastite - Diagnóstico. 4. *Streptococcus*. 5. Leite - Qualidade. 5. Erradicação de Doenças.

Palavras-chave: Ensaio clínico; Mastite bovina; Qualidade do leite; *Streptococcus agalactiae*; Testes diagnósticos.

Nome do Autor: Rodolfo Santos Rossi

Título: NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O AUMENTO DA EFICÁCIA DE PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EM REBANHOS LEITEIROS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Mores Rall

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia

IBB – UNESP – Botucatu

27 de abril de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu filho Gabriel Keiji e a toda minha família por me ajudarem e apoiarem durante a realização do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rubens e Jacira, pelos conselhos, exemplo e carinho. Por sempre me apoiarem desde o colégio agrícola, na graduação e durante todo o mestrado.

A minha esposa, Caroline, por estar sempre ao meu lado, me ajudar e me apoiar todos os dias. Obrigado por estar com nosso filho quando não pude estar, e por ser a melhor mãe do mundo, sempre com paciência, amor e carinho.

Aos meus sogros, Walter Takashi e Angélica Keika, por me acolherem como um filho, pelo carinho e por todo apoio.

Aos meus irmãos, Jakeline e Ricardo, pelos conselhos acadêmicos e pelo exemplo que me deram.

Ao meu orientador, Prof. José Pantoja, não somente por todo o conhecimento que tem me passado ao longo destes anos, mas também pela amizade, ajuda pessoal e conselhos.

Aos Professores Marcio Ribeiro e Paulo Domingues, pela atenção, pelos ensinamentos e ajuda durante o mestrado.

Aos meus colegas Arthur, Letícia e Simony, por toda ajuda, ensinamentos e amizade. Muito obrigado!

A minha família de Botucatu, todos os amigos da República D&C. E a todos amigos da FMVZ.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado Processo 132538/2015-6. E aos proprietários que concordaram voluntariamente em participar do projeto que originou esta dissertação de mestrado.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Taxas de cura microbiológica da mastite subclínica causada por <i>Streptococcus agalactiae</i> com diferentes protocolos de tratamento	35
---	----

Capítulo 2

Table 1. Characteristics of the herds enrolled into the study	65
--	----

Table 2. Cow characteristics after randomization	66
---	----

Table 3. <i>Streptococcus agalactiae</i> treatment efficacy and unadjusted bacteriological cure rates	67
--	----

Table 4. Adjusted <i>Streptococcus agalactiae</i> bacteriological cure rates	68
---	----

Capítulo 3

Table 1. Diagnostic accuracy of composite milk, Somaticell and CMT tests at different thresholds for cow and quarter diagnostic of <i>Streptococcus agalactiae</i> intramammary infection	92
--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figure 1. Graphical presentation for possible interpretations of the non-inferiority test considering different non-inferiority margins. The error bars indicate 95% confidence intervals (95% CI) for the difference between the bacteriological cure rates of the study groups. CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicillin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. The solid vertical line depicts the null difference between the treatments and the dotted vertical line depicts the maximum acceptable difference (0.10, 0.15, 0.20, and 0.25) between the treatments to conclude non-inferiority. The gray area depicts the non-inferiority zone for each non-inferiority margin. The horizontal lines with a central square depict the possible 95% CI in which non-inferiority can be determined. The horizontal line with a central circle depicts the possible 95% CI in which non-inferiority is inconclusive (Adapted from Piaggio et al., 2006)70

Figure 2. Geometric mean somatic cell count (SCC) of milk samples collected at initial screening (D0), and 14 (D14) and 21 (D21) d after the beginning of the treatments. The error bars indicate the 95% CI of the mean. CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicillin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. CEFIM: IM injection of cefquinome (1 mg/kg), every 24 h, for 3 d. CONTROL: did not receive any treatment or placebo71

Capítulo 3

Figure 1. Sensitivity and specificity of Somaticell (upper graph) (Madasa, São Paulo, Brazil) and California Mastitis Test (CMT) (lower graph) at different thresholds for quarter *Streptococcus agalactiae* intramammary infection diagnostic in 326 quarter milk samples. For CMT test, scores traces, 1, 2 and 3 represent trace, weak, distinct and strong positive results, respectively93

Figure 2. Receiver operating characteristics (ROC) non-parametric curves to diagnose *Streptococcus agalactiae* intramammary infection on the Somaticell (Madasa, São Paulo, Brazil) and California Mastitis Test (CMT) of 326 quarter milk samples. The solid and

dotted lines depict the Somaticell and CMT ROC curves, respectively. Thresholds were chosen based on Somaticell scale marked tube (circles) and the CMT scale (squares) of 0 (negative), traces (slight reaction), 1 (mild reaction), 2 (moderate reaction), and 3 (strong reaction). Microbiological examination of milk was used as the reference test. The area under the ROC curve for the Somaticell and the CMT was 94.5% (95% confidence interval: 91.8-97.2) and 92.0% (95% confidence interval: 88.6-95.4), respectively ($P = 0.09$)94

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AUC = *Area under the curve*

CAMP = Christie, Atkins e Munch-Peterson

CBT = Contagem bacteriana total

CCS = Contagem de células somáticas

CEFIM = Cefquinoma intramuscular

CEFIMM = Cefquinoma intramamária

CLOXIMM = Cloxacilina intramamária

CMT = *California Mastitis Test*

DEL = Dias em lactação

IC = Intervalo de confiança

IC95% = Intervalo de confiança de 95%

IIM = Infecção intramamária

IM = Intramuscular

IMM = Intramamário

ROC = *Receiver operating characteristics*

Δ = Margem de não-inferioridade

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
CAPÍTULO 2	38
RESUMO	40
CAPÍTULO 3	72
RESUMO	74
CAPÍTULO 4	95
DISCUSSÃO GERAL	95
CONCLUSÃO GERAL	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXO I – Normas de publicação da revista <i>Journal of Dairy Science</i>	109

ROSSI, R. S. **Novas estratégias para o aumento da eficácia em programas de erradicação de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos leiteiros**. Botucatu, 2017. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar novas estratégias de identificação e tratamento de mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae*. Dois estudos foram conduzidos para alcançar os objetivos propostos: 1) um ensaio clínico randomizado, para avaliar a eficácia do tratamento de *S. agalactiae* com cloxacilina intramamária (CLOXIMM), cefquinoma intramamária (CEFIMM) e cefquinoma intramuscular (CEFIM); e avaliar a não-inferioridade da CLOXIMM em relação a CEFIMM. E, 2) um estudo de acurácia diagnóstica, para estimar a acurácia do Somaticell, *California Mastitis Test* (CMT) e do exame microbiológico do leite composto (leite dos quatro quartos) na detecção de quartos e animais infectados com *S. agalactiae*. Os resultados indicaram que quartos tratados com CEFIM apresentaram menor taxa de cura bacteriológica (55%) do que aqueles tratados com CLOXIMM (86%) ou CEFIMM (98%). A diferença na proporção de cura bacteriológica entre CEFIMM e CLOXIMM foi de 0,121 (intervalo de confiança de 95%: 0,056 - 0,184). A CLOXIMM foi considerada não inferior a CEFIMM quando margens de não inferioridade de 0,20 e 0,25 foram utilizadas. Contudo, a determinação da não inferioridade foi inconclusiva para margens de 0,10 e 0,15. A cultura do leite composto apresentou acurácia diagnóstica satisfatória (95,7%) quando comparada a cultura individual por quarto. Para identificação dos quartos infectados com *S. agalactiae*, o ponto de corte considerado mais adequado foi de 205.000 células/mL para o teste Somaticell e escore 1 para o teste CMT. O teste Somaticell foi considerado mais acurado para uso em programas de erradicação, pois apresentou maior sensibilidade e menor proporção de resultados falso-negativos. Resultados deste estudo podem ser aplicados diretamente em nível de campo, para aumentar a eficiência de programas de erradicação de *S. agalactiae*.

Palavras-chave: qualidade do leite, mastite bovina, *Streptococcus agalactiae*, testes diagnósticos, ensaio clínico.

ROSSI, R. S. **New strategies of treatment for improving the efficacy of programs for eradication of *Streptococcus agalactiae* in dairy herds.** Botucatu, 2017. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of the present study was to assess new strategies to identify and treat *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis. Two studies were conducted to achieve the proposed objectives: 1) a randomized clinical trial, to assess the efficacy of intramammary cloxacillin (CLOXIMM), intramammary cefquinome (CEFIMM), and intramuscular cefquinome (CEFIM), to treat *S. agalactiae* intramammary infections (IMI); and assess whether CLOXIMM was non-inferior to CEFIMM to treat *S. agalactiae* IMI. And, 2) a diagnostic accuracy study, to estimate the accuracy of the Somaticell, California Mastitis Test (CMT), and the composite milk microbiological examination of milk to detect *S. agalactiae* IMI. Results indicated that the bacteriological cure rate was lower for quarters treated with CEFIM (55%), as compared with CLOXIMM (86%) or CEFIMM (98%). The bacteriological cure difference between CEFIMM and CLOXIMM was 0.121 (95% confidence interval: 0.056 - 0.184). The CLOXIMM was considered non-inferior to CEFIMM when the non-inferiority margins of 0.20 and 0.25 were considered. Nevertheless, determination of non-inferiority was inconclusive for margins of 0.10 and 0.15. Microbiological examination of composite milk was of high accuracy (95.7%), as compared with microbiological examination of quarter milk samples. The thresholds of 205,000 cells/mL for the Somaticell and of score 1 for the CMT can be considered the most appropriate for diagnosing *S. agalactiae* IMI. The higher sensitivity and lower proportion of false-negative results are characteristics that can justify the use of the Somaticell in *S. agalactiae* eradication programs, as an alternative to the CMT. Results of this study can be directly applied at the farm level, to improve the efficiency of *S. agalactiae* eradication programs.

Key Words: milk quality, bovine mastitis, *Streptococcus agalactiae*, diagnostic tests, clinical trial.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As perdas econômicas decorrentes da infecção intramamária por *Streptococcus agalactiae* geram grande impacto na rentabilidade da pecuária leiteira, estendendo-se das fazendas até as indústrias de laticínios. Estas perdas são decorrentes do aumento da incidência e prevalência das mastites clínica e subclínica e suas consequências, tais quais redução na produção de leite, aumento da frequência de tratamentos e descarte do leite, diminuição do valor comercial do leite cru devido ao aumento da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), redução no rendimento e qualidade dos derivados lácteos e diminuição da “vida de prateleira” do leite pasteurizado (KEFFE, 1997; MA et al., 2000).

No Brasil, nos últimos cinco anos a prevalência de mastite subclínica têm se mantido estável e em torno de 50% nos rebanhos (CASSOLI et al., 2012), ou seja, de cada duas vacas uma apresenta mastite. *Streptococcus agalactiae* é um dos principais patógenos causadores de mastite e seu controle ainda é um desafio na maioria dos rebanhos do Brasil. Brito et al. (1999) relataram prevalência de aproximadamente 60% entre rebanhos. Cruppe et al. (2008) relataram prevalência de 16,3% do agente em 2.671 amostras oriundas de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, e Souza et al. (2009) isolaram *S. agalactiae* em 21,1% das amostras provenientes de 24 rebanhos em Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Historicamente, nos países com uma indústria leiteira desenvolvida, programas de controle e erradicação de patógenos contagiosos resultaram em diminuição drástica na prevalência de *S. agalactiae* entre as décadas de 1970 e 1990 (KEFFE, 1997). Devido à sobrevivência limitada de *S. agalactiae* em ambientes externos à glândula mamária, a sua erradicação é possível por meio da identificação e tratamento sistemático dos animais infectados (“blitz-terapia”) e implementação de práticas preventivas de mastite contagiosa (ERSKINE; EBERHART, 1990). Diferentes autores demonstraram a viabilidade econômica desta abordagem no controle de *S. agalactiae* (YAMAGATA et al., 1987; EDMONDSON, 1989; ERSKINE; EBERHART, 1990).

Em programas de erradicação tradicionais as penicilinas naturais e semi-sintéticas, como a cloxacilina, são os fármacos de escolha, tratando-se todos os quartos de todos os animais infectados (FARNSWORTH et al., 2003). Taxas de cura bacteriológicas entre 77 e 100% foram reportadas após o tratamento intramamário com estes antimicrobianos

(WILSON et al., 1972; DAVIS et al., 1975; ERSKINE e EBERHART, 1990; WEAVER et al., 1986; WILSON et al., 1999; REYES et al., 2015). No entanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é importante para reduzir os custos com tratamento e descarte de leite, maximizar as taxas de cura por animal e evitar o desperdício de antimicrobianos administrados desnecessariamente em glândulas mamárias não infectadas.

Novos antimicrobianos como a cefquinoma, uma cefalosporina de quarta geração, estão disponíveis no mercado brasileiro e vem ganhando espaço para o tratamento da mastite. Contudo, estes antimicrobianos são listados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como de importância crítica para uso humano (WHO, 2012) e seu uso deve ser evitado caso houver fármacos tradicionais, tais como a cloxacilina, que apresentem a mesma eficácia terapêutica, evitando-se ao longo do tempo o surgimento de estirpes resistentes aos antimicrobianos de uso em medicina humana.

O desenvolvimento de programas de erradicação com maior viabilidade financeira e baseados no uso racional de antimicrobianos pode estimular a adesão dos produtores e contribuir para a melhoria da qualidade do leite e proteção da saúde pública. Nesse contexto, os objetivos gerais dos estudos contidos nessa dissertação foram avaliar a eficácia terapêutica de novas estratégias de tratamento de mastite subclínica causada por *S. agalactiae* e estimar a acurácia de diferentes testes diagnósticos utilizados para identificação desse patógeno e tratamento seletivo de glândulas mamárias infectadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA MASTITE CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

2.1.1 ETIOLOGIA E PATOGENIA

Streptococcus agalactiae pertence ao Grupo B de Lancefield dos estreptococos. A primeira identificação como patógeno da glândula mamária ocorreu em 1889 por Nocard e Mollereau. Inicialmente foi denominado de *Streptococcus nocardii* e posteriormente reclassificado como *Streptococcus agalactiae* (KEEFE, 1997). Esse patógeno é obrigatório da glândula mamária dos bovinos, de comportamento altamente contagioso (KEEFE, 2012), capaz de sobreviver por longos períodos na glândula mamária de vacas

secas ou mesmo na glândula imatura de novilhas (EDMONDSON, 1989). Contudo, a sobrevivência fora deste ambiente é limitada (KEEFE, 2012).

Streptococcus agalactiae infecta primariamente a cisterna e o sistema de ductos lactíferos da glândula mamária, apresenta baixa invasibilidade tecidual e sobrevive principalmente na superfície epitelial. No início da infecção, ocorre irritação local com inflamação tecidual, originada pela produção de ácido láctico pelo patógeno (EDMONDSON, 1989; NMC, 2015a). Esta infecção é, na maioria das vezes, subclínica com episódios clínicos ocasionais. Com a cronicidade da infecção, o acúmulo de metabólitos residuais das bactérias intensifica a resposta inflamatória acarretando na destruição do tecido secretor e redução na produção de leite ou mesmo agalactia, embora o quadro clínico raramente tem apresentação grave (NMC, 2015a). Durante o período de infecção, os quartos não infectados da mesma glândula podem aumentar sua produção e compensar a perda na produção de leite do quarto afetado (HAMANN; REICHMUTH, 1990). Contudo, para o quarto acometido cicatrizes extensas do tecido secretor podem torná-lo improdutivo em lactações subsequentes (NMC, 2015a).

Recentemente Mahmmond et al. (2015) classificaram isolados de *S. agalactiae* de acordo com o complexo clonal (CC) obtido por tipagem de sequências multilocus. Três complexos clonais foram identificados CC1, CC19 e CC23. Os resultados apresentados pelos autores sugeriram que o CC23 apresentou a menor patogenicidade. Para o CC23, a concentração bacteriana e de células somáticas no leite de quartos infectados apresentaram valores numericamente inferiores quando comparado aos outros complexos clonais. Estudos adicionais são necessários para avaliar a patogenicidade de diferentes clones de *S. agalactiae*.

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Nos países com uma indústria leiteira desenvolvida houve, ao longo do tempo, redução gradual na prevalência e incidência de *S. agalactiae* nos rebanhos. Nos Estados Unidos, 1982, Eberhart; Hutchinson; Spencer (1982) relataram que 60% (N = 29) dos rebanhos apresentavam pelo menos um animal infectado com *S. agalactiae*. Em 1985, Hogan et al. (1987) coletaram amostras de leite do tanque de 2.931 fazendas e observaram prevalência de 47% de rebanhos positivos. Em 1990, o mesmo estudo foi realizado em 1.971 fazendas que ainda se encontravam em produção, revelando prevalência de 32% (GOLDBERG et al., 1991).

Em 1986, nos EUA, 44% das amostras de leite de tanque oriundas de 50 rebanhos foram positivas para o isolamento de *S. agalactiae* (GONZALEZ et al., 1986). Em 1988, Gonzalez et al. (1988) observaram 94% (N = 50) dos rebanhos com pelo menos um animal infectado. No Estado de Ohio (EUA), 56% (N = 48) dos rebanhos apresentavam pelo menos uma amostra positiva, com prevalência média de 10% de animais positivos por rebanho (BARTLETT et al., 1992). Wilson, Gonzalez, Helena (1997), acompanharam 108.312 vacas em 1.601 fazendas entre janeiro de 1991 e junho de 1995 e reportaram uma prevalência de 10,1% de animais infectados com *S. agalactiae*.

No Canadá, em Prince Edward Island, entre dezembro de 1992 e junho de 1994, amostras do tanque de todos os rebanhos (N = 452) foram testadas em dois momentos diferentes para determinar a prevalência e incidência de *S. agalactiae*. A prevalência estimada foi de 18,9% e 14,4% para dezembro de 1992 e junho de 1994, respectivamente. A avaliação de junho de 1994 demonstrou incidência de 3,5 novos rebanhos infectados por 100 rebanhos por ano (KEEFE; DOHOO; SPANGLER, 1997). Em 2004, um novo estudo de prevalência foi realizado por Riekerink et al. (2006), no qual amostras do leite do tanque foram obtidas de todos os 258 rebanhos leiteiros de Prince Edward Island. A prevalência de *S. agalactiae* foi de 1,6%. Na Dinamarca, uma possível re-emergência de *S. agalactiae* tem sido observada, com aumento na prevalência deste patógeno nos rebanhos de 2 para 6,1% entre os anos de 2000 e 2009 (KATHOLM et al., 2012).

Em outros países, a presença de *S. agalactiae* ainda é comum nos rebanhos. No litoral oeste do Uruguai, 4.308 amostras de 1.077 vacas oriundas de 29 fazendas foram testadas para determinar a prevalência de mastite subclínica (CCS > 300.000 células/mL). Do total, 52,4% das vacas e 26,4% dos quartos foram diagnosticados com mastite subclínica, dos quais *S. agalactiae* foi encontrado em 11,3% das amostras (GIANNEECHINI et al., 2002). Em rebanhos da Colômbia foram relatadas prevalências de 27 a 35% de animais infectados (RAMÍREZ et al., 2014; REYES et al., 2015). Na China, 63% dos rebanhos (N = 33) e 16% dos animais (N = 619) foram positivos para *S. agalactiae* (YANG et al., 2013). Na Tailândia o mesmo patógeno foi encontrado em 7,1% de 520 amostras que foram positivas ao *California Mastitis Test* (CMT) (LEELAHAPONGSATHON; SCHUKKEN; SURIYASATHAPORN, 2014).

No Brasil, estudos demonstram elevada e constante prevalência de *S. agalactiae* ao longo dos anos. Na bacia leiteira do Rio de Janeiro, 8.748 quartos de 2.187 vacas em lactação de 43 fazendas foram avaliadas. A prevalência de mastite subclínica relatada foi de 20% em nível de vaca e de 9,3% em nível de quarto, pelo teste de CMT. *Streptococcus*

agalactiae foi um dos patógeno mais prevalentes, encontrado em 24,7% dos animais (LANGENEGGER et al., 1970). No Agreste Meridional do estado de Pernambuco, 860 vacas em lactação de 20 fazendas foram triadas pelo teste CMT, revelando 39% de animais afetados. Ao exame microbiológico do leite, 31,7% das vacas apresentaram infecção intramamária, dentre as quais 14,1% por *S. agalactiae* (HARROP et al., 1975).

Em Minas Gerais foram realizados exames microbiológicos de 6.315 amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários de 1.609 vacas em lactação oriundas de 48 rebanhos, com o isolamento de agentes patogênicos em 3.919 amostras. *Streptococcus agalactiae* foi encontrado em 6,9% das amostras e em 60% dos rebanhos. Nesse mesmo estudo, a média de quartos infectados por animal foi de 2,7 (BRITO et al., 1999).

Em 2007, no estado do Paraná, foram amostrados 427 quartos positivo ao CMT, dos quais *S. agalactiae* foi isolado de 2,8% (SANTOS; PEDROSO; GUIRRO, 2010). Cruppe et al. (2008) relataram prevalência de 16,3% do agente em 2.671 amostras provenientes de quatro estados brasileiros (Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo). Souza et al. (2009) isolaram o mesmo agente em 21,1% das amostras de leite (N = 3.987) de vacas de 24 rebanhos em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Em 2010, *S. agalactiae* foi isolado de 3,1% de 381 amostras compostas obtidas em 21 propriedades do sudoeste do estado do Paraná (MELLO et al., 2012).

Em diferentes regiões do estado de São Paulo (São Pedro, Nova Odessa, Pirassununga, Porto Feliz, Paraibuna e Botucatu), 283 vacas foram triadas pelo teste de CMT e 1.090 quartos positivos ao teste foram amostrados. *Streptococcus agalactiae* foi isolado de 8,6 e 12,5% dos quartos positivos para casos de mastite subclínica e clínica, respectivamente (LANGONI et al., 2011). No Brasil, não há estudos atuais que avaliem a prevalência do patógeno em uma amostra representativa do território nacional, limitando avaliar a dimensão do impacto negativo das infecções por *S. agalactiae* na produção e qualidade do leite nacional.

Recentemente, Leelahapongsathon et al. (2016) reportaram alguns índices de transmissão de *S. agalactiae* baseados em dados de rebanhos com surtos de mastite causada por este patógeno. O parâmetro de transmissão (β), que representa a probabilidade por unidade de tempo de que um quarto infectado transmitirá *S. agalactiae* para outro quarto (supondo-se que todos os outros quartos são susceptíveis), foi de 0,0068 por mês (intervalo de confiança 95%: 0,0008 - 0,0606). A duração média da infecção intramamária causada por *S. agalactiae* foi de 270,8 dias (erro padrão = 17,3). Com base nestes parâmetros os autores calcularam o número reprodutivo básico (R_0) de 1,86 por

mês (intervalo de confiança 95%: 0,21 - 16,61), que representa o número médio de infecções secundárias resultantes da introdução de um quarto infectado com *S. agalactiae* em uma população totalmente susceptível. Os autores reportaram ainda taxa de incidência de 0,09 novos casos de *S. agalactiae* por 30 dias em risco, em nível de quarto (mínimo = 0,00, máximo = 0,22).

2.1.3 IMPACTO ECONÔMICO

A prevalência de mastite nos rebanhos e a qualidade do leite são alguns dos principais fatores que interferem na rentabilidade da atividade leiteira e da indústria de laticínios (ERSKINE, 1992). Frost e Sanderson (1965) já estimavam perda de aproximadamente 9 milhões de libras por ano para a indústria láctea australiana devido a mastite subclínica, causada especificamente por *S. agalactiae*. Na indústria, este patógeno afeta diretamente a produção e qualidade dos derivados lácteos. O leite oriundo de animais infectados resulta em queijos e outros derivados de pior qualidade (POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988). As mudanças na composição do leite reduzem o seu valor nutricional, aumentando os problemas de processamento e, consequentemente, aumentando a quantidade de produtos fora dos padrões de produção. Além disso, a vida de prateleira do leite fluido também é reduzida devido ao aumento na carga de bactérias residuais do leite (MA et al., 2000).

Natzke et al. (1972) realizaram um estudo longitudinal de 3 anos e reportaram perdas de produção de leite (ajustado para 305 dias em lactação) para animais infectados com *S. agalactiae* de 860 Kg (2,82 Kg/dia) para novilhas (N = 178), 658 Kg (1,16 Kg/dia) para vacas (N = 272) em segunda lactação e 809 Kg (2,65 Kg/dia) para vacas em terceira ou mais lactações (N = 1.084). Contudo, este estudo foi conduzido em animais que apresentavam somente um quarto infectado e, como a infecção entre quartos de uma mesma vaca é comum (BRITO et al., 1999), é possível que a perda de leite em condições reais seja ainda maior. Ademais, para o cálculo da redução na produção de leite utilizou-se a produção composta dos quatro quartos, o que poderia subestimar a redução na produção devido ao aumento compensatório na produção dos quartos adjacentes não infectados (HAMANN; REICHMUTH, 1990). No entanto, o estudo revelou a real redução de produção de leite em condições nas quais um único quarto esteja infectado com *S. agalactiae*.

Wilson, Gonzalez, Helena (1997), em estudo retrospectivo, coletaram amostras compostas de leite para diagnóstico de infecção intramamária, registrando a redução na

produção de leite e perda econômica por patógeno. Os animais sadios (negativos ao exame microbiológico do leite, N = 18.906) foram utilizados como referência para o cálculo do prejuízo econômico e apresentaram produção de leite ajustada para 305 dias em lactação de 9.578 Kg (31,4 Kg/dia). Para *S. agalactiae* (N = 1.345 animais infectados), a perda econômica estimada foi de US\$ 388,19, com produção de leite de 8.220 kg (26,9 Kg/dia), 1.358 Kg de leite a menos do que os animais sadios (redução de 14,2%, ou de 4,5 Kg/dia). Neste mesmo estudo, a perda econômica para o *Staphylococcus aureus* (N = 2.286 animais infectados) foi de US\$ 185,51, com produção de 8.929 Kg de leite (redução de 6,7%, ou de 2,1 Kg/dia).

A redução na produção de leite de vacas com mastite subclínica pode ainda ser estimada pela CCS. O leite de quartos infectados com *S. agalactiae* apresenta CCS média entre 900.000 e 2.238.000 células/mL (ERSKINE et al., 1987). A partir de 50.000 células/mL, cada vez que a CCS dobra, estima-se uma perda de 0,4 Kg de leite/dia na primeira lactação e de 0,6 Kg de leite/dia em vacas com duas ou mais lactações (HORTET; SEEGER, 1998). Degraes e Fetrow (1993) relataram que cada aumento na CCS do tanque de 100×10^3 células/mL acima do limite de 200×10^3 células/mL foi associado a redução média de 2% na produção de leite do rebanho.

Além da elevada CCS, rebanhos contendo animais infectados com *S. agalactiae* frequentemente apresentam CBT do tanque elevada, variando de 20.000 a 100.000 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL (HOGAN; SMITH, 1992; NMC, 2015b). Quartos infectados com *S. agalactiae* de animais nos primeiros estágios de infecção podem eliminar até 100.000.000 bactérias/mL (GUTERBOCK; BLACKMER, 1984). Além das perdas citadas, os animais com mastite subclínica podem apresentar episódios clínicos ocasionais que necessitam de tratamento com antimicrobianos e descarte de leite (NMC, 2015a), aumentando o risco de resíduos de fármaco no leite do tanque.

2.2. DIAGNÓSTICO

2.2.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

O exame microbiológico do leite é o método de referência para identificação dos patógenos causadores de mastite. Especificamente para *S. agalactiae*, assume-se que o exame microbiológico do leite apresente sensibilidade de 95% e especificidade de 100% (DINSMORE et al., 1991). A alta acurácia de identificação microbiológica de *S.*

agalactiae deve-se ao fato da grande eliminação de bactérias em quartos infectados (KEEFE, 1997).

O isolamento de *S. agalactiae* e diferenciação dos outros patógenos causadores de mastite podem ser realizados pelo cultivo inicial em ágar sangue. Após 24 h de incubação, os estreptococos apresentam-se como colônias pequenas, translúcidas ou acinzentadas, com α -, β - ou γ -hemólise (MARKEY et al., 2013), e na coloração pelo método de Gram, as colônias apresentam-se como cocos Gram-positivos. Para diferenciação entre estreptococos e estafilococos pode-se realizar o teste da catalase. Os estreptococos são catalase-negativa, enquanto os estafilococos são catalase-positiva (MARKEY et al., 2013).

A diferenciação de *S. agalactiae* dos outros estreptococos causadores de mastite (*S. dysgalactiae*, *S. uberis* e *Enterococcus* spp.) pode ser realizada pelo cultivo em meios MacConkey e Edwards, e pelo teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson). No meio MacConkey, somente é observado o isolamento de *Enterococcus* spp., como colônias pontuais avermelhadas, devido a sua capacidade de tolerar os sais biliares presentes no meio. Já no meio Edwards é observado isolamento de todas as espécies de estreptococos. Contudo, somente *S. uberis* e *Enterococcus* spp. são capazes de hidrolisar a esculina, indicada pela coloração marrom escura ou negra das colônias e do meio. No teste CAMP, *S. agalactiae* é a única espécie capaz de formar uma figura semelhante a “seta” em virtude do sinergismo de efeito hemolítico de *S. agalactiae* com a β -hemólise produzida pelo *S. aureus*. Tradicionalmente a reação CAMP é realizada estriando-se colônias de estreptococos perpendicularmente a uma estria de *S. aureus* em meio ágar sangue (BROWN et al., 1974).

Como alternativa ao cultivo em meio Edwards e MacConkey, podem ser realizados os cultivos em meio Esculina e Bile-esculina. A interpretação dos resultados é semelhante à descrita anteriormente, ou seja, no meio Esculina todas as espécies de estreptococos apresentam isolamento, mas somente *S. uberis* e *Enterococcus* spp. possuem a capacidade de hidrolisar a esculina apresentando coloração marrom escuro ou negra das colônias (QADRI; SILVA; ZUBAIRI, 1980; ODIERNO et al., 2006). Já no meio Bile-esculina, somente o *Enterococcus* spp. é capaz de tolerar os sais biliares do meio, indicado pela formação de coloração marrom escura ou negra (CHUARD; RELLER, 1998). Sistemas de identificação comercial para estreptococos também estão disponíveis, como o API 20Strep (bioMérieux®) (MARKEY et al., 2013).

2.2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Diversos métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm sendo desenvolvidos para detecção e identificação de estreptococos. Os métodos incluem a PCR convencional, a PCR em tempo real e a multiplex PCR. O gene 16S rRNA é frequentemente utilizado como gene-alvo para reação (MARKEY et al., 2013). Os métodos de identificação molecular apresentam alta sensibilidade para amostras em nível de vaca e de tanque quando comparados às técnicas convencionais de exame microbiológico do leite. Particularmente para *S. agalactiae* a especificidade é muito elevada, o que se deve ao fato de *S. agalactiae* ser um patógeno obrigatório e estrito da glândula mamária (KOSKINEN et al., 2009, 2010).

Gillespie e Oliver (2005) avaliaram a PCR em tempo real em 57 amostras de leite obtidas de quartos sabidamente infectados com *S. agalactiae*. Após a pré-incubação por 24 h, o teste identificou corretamente 98,2% das amostras. Elias et al. (2012) utilizaram exame microbiológico do leite e PCR para identificação de *S. agalactiae*, em amostras de tanque de 247 rebanhos. O patógeno foi identificado em 39,7% e 44,5% das amostras submetidas ao exame microbiológico do leite e PCR, respectivamente, sugerindo maior sensibilidade da PCR na identificação de *S. agalactiae*. Em outro estudo conduzido em amostras de leite de tanque de 4.258 rebanhos da Dinamarca, em 2009, a sensibilidade da PCR (95,2%) foi significativamente maior do que a do exame microbiológico do leite (68,0%). Já a especificidade do exame microbiológico do leite (99,7%) foi numericamente maior do que a da PCR (98,8%) (MWEU et al., 2012).

2.2.3 ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO

Diferentes estratégias de coleta de amostras de leite para exame microbiológico podem ser realizadas para identificação e monitoramento de *S. agalactiae* em rebanhos, animais ou quartos. De acordo com Riekerink et al. (2006), o exame microbiológico do leite do tanque é uma importante ferramenta para o monitoramento deste patógeno nos rebanhos. Devido às características de *S. agalactiae* como patógeno obrigatório da glândula mamária, e pela eliminação de grande quantidade de bactérias no leite nos quartos infectados, pode-se supor que a presença do micro-organismo no leite do tanque seja oriunda exclusivamente de quartos infectados no rebanho (KEEFE, 1997).

Embora a especificidade do exame microbiológico do leite do tanque seja elevada, a sensibilidade é considerada variável. A capacidade de identificação de *S. agalactiae* no leite do tanque depende diretamente da prevalência do patógeno dentro do rebanho

(KEEFE, 2012). Rebanhos com alta prevalência apresentam grande quantidade de bactérias no tanque, logo, métodos de cultivo tradicionais resultam em sensibilidade satisfatória. Contudo, conforme a prevalência diminui, a sensibilidade dos métodos convencionais de exame microbiológico também é reduzida (KEEFE, 2012).

Em estudo de 49 rebanhos, resultados do exame microbiológico do leite do tanque foram comparados aos resultados de amostras de quartos. A prevalência de *S. agalactiae* em nível de rebanho (um rebanho foi considerado positivo se houvesse pelo menos um quarto positivo) foi de 35%. A sensibilidade e especificidade do exame microbiológico do leite do tanque foram de 35% e 97%, respectivamente (BARTLETT et al., 1991). Gonzalez et al. (1986) compararam amostras compostas de vacas com amostras de leite do tanque obtidas de 23.123 vacas em 50 rebanhos. A sensibilidade do exame microbiológico do leite do tanque foi de 50% em comparação as amostras individuais dos animais. Em rebanhos sabidamente positivos, nos quais *S. agalactiae* não foi isolado do leite do tanque, observou-se, em média, 3,9% dos animais infectados. Já em rebanhos com isolamento do patógeno no leite do tanque, observou-se, em média, 18% dos animais infectados. De acordo com Farnsworth; Stewart; Reid (2003), o cultivo do leite do tanque em meio TKT (“thallium sulfate-crystal violet-B toxin blood agar”) foi capaz de identificar um quarto infectado em um rebanho de 40 animais.

Uma estratégia para contornar a variabilidade na sensibilidade do exame microbiológico do leite do tanque na identificação de *S. agalactiae* seria o monitoramento longitudinal do rebanho com amostragens repetidas em curtos intervalos de tempo, aumentando a sensibilidade do exame (RIEKERINK et al., 2006). Em grandes rebanhos, a amostragem estratégica de animais com alta CCS, ou de animais com mastite clínica, também pode ser utilizada para o monitoramento (DINSMORE, 2002).

A determinação da sensibilidade e especificidade do exame microbiológico do leite na identificação de animais e quartos infectados por *S. agalactiae* é difícil de ser estabelecida, uma vez que não há referência (padrão-ouro) para avaliação destes índices de acurácia diagnóstica (KEEFE, 1997). A amostragem em duplicata poderia aumentar a capacidade de identificação de *S. agalactiae*; contudo, Dinsmore et al. (1991), Erskine; Eberhart (1988) avaliaram a coleta de amostras duplicadas e não observaram aumento significativo na sensibilidade do exame microbiológico do leite para patógenos contagiosos. Considerando a acurácia de identificação de animais positivos para *S. agalactiae* em amostras compostas, Dinsmore et al. (1991) avaliaram três diferentes tipos de inóculos: 10 µL de leite proveniente de amostras compostas semeados em meia placa

de ágar sangue, 10 µL de leite proveniente de amostras de quarto semeados em meia placa de ágar sangue e 50 µL de leite proveniente de amostras compostas semeados em uma placa inteira de ágar sangue. Noventa e cinco por cento das vacas consideradas infectadas por *S. agalactiae* por meio do exame microbiológico de amostras de leite de todos os quartos dos animais também foram consideradas como positivas por meio de uma única amostra composta (DINSMORE, et al., 1991). Além disso, nenhuma diferença foi observada na classificação do *status* dos animais quando semeados volumes de 10 ou 50 µL de leite oriundos de amostras compostas.

Variações no método de exame microbiológico tradicional podem influenciar no isolamento de *S. agalactiae*. Diferentes estudos investigaram a influência do congelamento de amostras de leite positivas para *S. agalactiae* e não observaram efeito sobre a recuperação de bactérias. Amostras de leite refrigeradas ou congeladas, oriundas do leite do tanque, ou do leite de animais individuais, podem ser utilizadas com sucesso para o isolamento deste patógeno (SCHUKKEN et al., 1989; DINSMORE et al., 1991, 1992; MURDOUGH; DEITZ; PANKEY, 1996). O congelamento a -20°C de amostras compostas antes do exame microbiológico aumentou a frequência de isolamento de *S. agalactiae* em 2,5 vezes, quando comparado ao cultivo sem congelamento prévio (VILLANUEVA; TYLER; THURMOND, 1991).

Thurmond et al. (1989) relataram que a pré-incubação de amostras compostas em caldo *Brain Heart Infusion* aumentou a frequência de isolamento de bactérias, aumentando a porcentagem de vacas classificadas como infectadas por *S. agalactiae* de 6,2% para 10,8%. Dinsmosre et al. (1992) avaliaram o efeito da utilização de diferentes métodos aprimorados de exame microbiológico do leite na recuperação de *S. agalactiae*, comparando o resultado do cultivo direto em ágar sangue após o pré-congelamento, pré-incubação antes do cultivo e aumento do volume do inóculo. Embora houvesse aumento na taxa de isolamento de outras espécies, a recuperação de *S. agalactiae* não foi alterada, provavelmente devido à grande concentração de bactérias eliminadas no leite de animais infectados.

2.3 TRATAMENTO

Uma grande variedade de produtos comercialmente disponíveis tem sido utilizada no tratamento da mastite causada por *S. agalactiae* durante a lactação. O princípio ativo, a via de administração, o custo, o período de tratamento e descarte de leite são alguns dos fatores que podem influenciar na escolha do antimicrobiano. Diferentes autores têm

reportado taxas variáveis de cura para casos de mastite subclínica causada por *S. agalactiae* (Tabela 1).

2.3.1 TIPOS DE TRATAMENTO

A escolha da via de administração do fármaco depende, dentre outros fatores, do local de acúmulo do antimicrobiano, o qual pode ser o leite ou o tecido mamário. Em geral, o local depende do agente causador da mastite. Patógenos como *S. agalactiae*, *Corynebacterium* spp. e estafilococos coagulase-negativa permanecem primariamente no leite fluido e tecido superficial, enquanto *S. aureus* penetra no tecido mamário causando infecção profunda e intracelular (PYORALA, 2009).

A via de administração mais comum para o tratamento da mastite é a via intramamária (IMM). As vantagens desta via, em comparação à via parenteral, são a alta concentração do princípio ativo alcançada no leite e o menor consumo do antimicrobiano, visto que o fármaco é infundido diretamente no quarto mamário (PYORALA, 2006). As desvantagens da administração via IMM estão relacionadas à distribuição desigual do antimicrobiano no tecido mamário e ao risco de infecção iatrogênica do quarto em tratamento, devido à higiene inadequada no momento da infusão (PYORALA, 2009).

No tratamento da mastite por via parenteral as vantagens estão relacionadas ao fato do fármaco apresentar melhor distribuição e penetração por todo o tecido mamário, tornando-se uma alternativa mais eficiente no controle de agentes que invadem este tecido. Já as desvantagens estão relacionadas ao fato da administração ser mais dolorosa e por necessitar de doses maiores, quando comparada à administração por via IMM (KALMUS et al., 2014). Contudo, é difícil alcançar e manter concentrações terapêuticas desejadas no leite, ou mesmo no tecido mamário, por meio da administração parenteral.

Poucos grupos de antimicrobianos apresentam características farmacológicas ótimas para o tratamento da mastite pela via parenteral (PYORALA, 2009), incluindo macrolídeos, fluorquinolonas e certos derivados de beta-lactâmicos. Espiramicina, tilosina e penetamato têm sido utilizadas no tratamento da mastite causada por estreptococos por via IM. O penetamato é um antimicrobiano de maior lipossolubilidade do que a penicilina G, que se difunde melhor para o leite e atinge concentrações terapêuticas satisfatórias (MCDUGALL et al., 2007). Particularmente na mastite subclínica causada por *S. agalactiae*, uma grande vantagem da administração sistêmica seria a facilidade do manejo terapêutico, uma vez que a via IM possibilita o tratamento dos quatro quartos de um mesmo animal em apenas uma única administração.

2.3.2 FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA MASTITE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A eficácia do tratamento da mastite subclínica causada por *S. agalactiae* depende principalmente do antimicrobiano (princípio ativo) escolhido (WILSON et al., 1999). Vários estudos têm relatado a eficiência do tratamento durante a lactação utilizando diferentes fármacos (ERSKINE e EBERHART, 1990; DEGRAVES e FETROW, 1993; WILSON et al., 1999).

Wilson et al. (1999) avaliaram retrospectivamente o desfecho da cura bacteriológica da mastite subclínica bovina, comparando a administração de sete diferentes tipos de antimicrobianos intramamários versus o não tratamento. Para a avaliação da cura, amostras de leite foram coletadas dos animais positivos após 30 dias do primeiro exame microbiológico. Ao todo foram analisados 9.007 casos. Especificamente para a mastite causada por *S. agalactiae* (N = 1.927), os casos tratados tiveram taxa de cura de 77%, a qual foi significativamente maior do que a taxa de cura (27%) dos animais não tratados. As taxas de cura significativamente diferentes do grupo não tratado para cada princípio ativo administrado foram as seguintes: amoxicilina 86% (N = 829), cefapirina 66% (N = 175), cloxacilina 77% (N = 487), eritromicina 81% (N = 96), hetacilina 62% (N = 45), e penicilina 63% (N = 222). Somente a pirlimicina não diferiu entre os grupos tratado e não tratado (44%; N = 37).

A penicilina é o antibiótico de escolha para o tratamento de mastite causada por *S. agalactiae*. Contudo, outros antimicrobianos também podem ser utilizadas com resultados semelhantes à penicilina (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003). Weaver et al. (1986) avaliaram o tratamento de 228 animais infectados por *S. agalactiae* identificados por amostragem composta, com diferentes preparações de penicilina: uma preparação comercial contendo 1.000.000 UI de penicilina G procaína e 150 mg de novobiocina IMM, em todos os quartos (independentemente do *status* de infecção), por 2 dias com intervalo de 24 h; e outra contendo uma solução de 1.200.000 de UI de penicilina G procaína em 10mL de solução salina estéril de igual posologia. A cura foi determinada como a ausência de *S. agalactiae* em exame microbiológico realizado após 21-25 dias do tratamento. Para a preparação comercial a taxa de cura foi de 94% (87/92), enquanto para a segunda solução a taxa de cura foi de 87% (N = 136).

Craven (1987) revisou 11 artigos relacionados ao tratamento de *S. agalactiae* com penicilina e reportou taxa de cura média de 84%. Erskine e Eberhart (1990) trataram os quatro quartos de animais infectados com *S. agalactiae* em um programa de erradicação

em “blitz-terapia”. O tratamento foi baseado em produto intramamário contendo 150 mg de novobiocina e 100.000 UI de penicilina G procaína (duas infusões com intervalo de 24 h) com exame microbiológico realizado 30 dias após a administração do produto. A taxa de cura observada foi de 92,6% (N = 305) e 88,3% (N = 137) em níveis de quarto e vaca, respectivamente. Yamagata et al. (1987) descreveram taxa de cura de 98% com tratamentos repetidos baseados no uso de penicilina (106 UI) ou penicilina (105 UI) com novobiocina (150 mg), em programa de erradicação de *S. agalactiae*.

A cloxacilina é uma penicilina semi-sintética resistente às penicilinases, ácido-estável e com ação contra a maioria das bactérias Gram-positivas. Kingwill et al. (1970) relataram que a cloxacilina foi eficiente em eliminar 98% das infecções intramamárias causadas por *S. agalactiae*. Wilson et al. (1972) avaliaram em 16 rebanhos o efeito da administração de cloxacilina em todos os quartos de animais com mastite subclínica. Quatro condutas terapêuticas foram adotadas: 1) 0,2 g de cloxacilina sódica de liberação rápida; 2) 0,6 g de cloxacilina sódica de liberação rápida; 3) 0,2 g de cloxacilina sódica de liberação lenta; e, 4) 0,6 g de cloxacilina sódica de liberação lenta. A cura bacteriológica foi avaliada em amostras de leite cultivadas 21 e 28 dias após o tratamento. Em todas as infecções por *S. agalactiae* houve 100% de cura bacteriológica (100/100, aproximadamente 25 animais por tratamento). Davis et al. (1975) avaliaram a eficácia do tratamento durante a lactação de mastite clínica e subclínica com cloxacilina (300 mg em três ordenhas consecutivas). Neste estudo os agentes de principal interesse foram *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. Considerando o tratamento dos animais com mastite subclínica causada por *S. agalactiae*, 92% (N = 74) apresentaram cura bacteriana, avaliada 21 dias após o último dia da administração do medicamento.

As cefalosporinas são antibióticos semissintéticos derivados da cefalosporina C (produzida por *Cephalosporium acremonium*). São conhecidas quatro gerações classificadas de acordo com o espectro de ação (HORNISH e KOTARSKI, 2002). O ceftiofur é uma cefalosporina de terceira geração, de amplo espectro bactericida, que age por meio da inibição da síntese da parede celular, interferindo nas enzimas essenciais para a síntese de peptídeoglicanos. Este fármaco é efetivo contra grande número de patógenos contagiosos e ambientais causadores de mastite (OLIVER et al., 2004).

A cefquinoma é uma cefalosporina de quarta geração estável a β -lactamases. Apresenta melhora na atividade antimicrobiana quando comparada com a segunda e terceira gerações de cefalosporinas (ZONCA et al., 2011), e apresenta baixa difusão para a circulação sistêmica após administração intramamária (EHINGER; SCHMIDT;

KIETZMANN, 2006). Nas vacas em lactação a cefquinoma é utilizada usualmente por via intramamária para o tratamento de mastite clínica causada por coliformes, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *S. aureus* (EMEA, 2009). Zonca et al. (2011) estudaram a farmacocinética da administração intramamária de sulfato de cefquinoma e relataram que a concentração inibitória mínima (MIC90) para *S. agalactiae* varia entre $< 0,03$ e $0,13 \mu\text{g/mL}$. Com três administrações a cada 12 h, na dosagem máxima permitida pelo fabricante (75 mg de cefquinoma por quarto), o tempo durante o qual a concentração do fármaco foi mantida acima da MIC no tecido mamário foi de 94 h e 54 h, respectivamente. Dentre a literatura consultada não foi encontrado nenhum ensaio clínico avaliando a eficácia do tratamento de cefquinoma intramamário em casos de mastite subclínica em vacas causada por *S. agalactiae*.

Keefe (1997), em artigo de revisão, reportou estudos *in vitro* nos quais a resistência de *S. agalactiae* contra diversos antimicrobianos foi avaliada. Em estudo conduzido por Brown e Scasserra (1990), 39 isolados oriundos de seis estados norte-americanos foram testados, dos quais 100% foram sensíveis a penicilina, 95% a lincomicina e 75% as tetraciclina, com sensibilidade das estirpes muito reduzida para estreptomicina e espectinomicina. No Brasil, 85 isolados de *S. agalactiae* obtidos de mastite clínica e subclínica foram avaliados quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos. Todos os isolados foram resistentes à gentamicina, enquanto 44,7 e 10,5% foram resistentes a tetraciclina e eritromicina, respectivamente (DUARTE et al., 2004). Segundo Pitkala et al. (2004) os estreptococos causadores de mastite têm permanecido sensíveis à penicilina G. De modo geral, a sensibilidade de *S. agalactiae* tem-se mantido alta a grande maioria dos antimicrobianos de uso na mastite bovina (TYLER; WILSON; DOWLING, 1992; ERSKINE et al., 2002; MAKOVEC e RUEGG, 2003).

2.3.3 VIABILIDADE ECONÔMICA E FATORES QUE INFLUENCIAM NO SUCESSO DO TRATAMENTO

Dois estudos avaliaram a viabilidade econômica e reportaram vantagens do tratamento de animais infectados com *S. agalactiae* durante a lactação. Yamagata et al. (1987) realizaram um estudo de caso-controle híbrido para avaliar a relação benefício/custo do tratamento com penicilina (106 UI) ou penicilina (105 UI) com novobiocina (150 mg) em casos de mastite subclínica causados por *S. agalactiae*, utilizando modelos de simulação de curva de lactação. A produção de leite utilizada para o cálculo foi ajustada para 305 dias em lactação e para os principais fatores biológicos

que influenciam o padrão da curva de lactação. A taxa de cura observada foi de 98% com retratamentos (N = 99). No geral, a produção de leite de 48 casos com mastite subclínica causada por *S. agalactiae* tratados e curados (6.840 Kg) não foi significativamente diferente da produção de leite dos 48 controles (6.738 Kg). Contudo, a variação na produção de leite entre casos e controles dependeu do momento no qual ocorreram as infecções. O modelo de redução da produção de leite demonstrou uma queda de aproximadamente 25% para as vacas infectadas com 14 dias em lactação; 16% para aquelas infectadas com 63 dias; e 8% para as infectadas com 126 dias, ao longo dos 305 dias de lactação.

O programa de tratamento apresentou lucro líquido de US\$ 21.130,00 (lucro líquido = ganhos com a produção de leite + renda com o descarte de animais – custo de tratamento – custo de reposição dos animais descartados). A taxa geral de benefício/custo do programa em “blitz-terapia” foi de 2,25/1. O benefício/custo por animal foi maior para vacas que estavam no início da lactação US\$ 396,00 (0-60d), quando comparado com vacas no meio da lactação US\$ 237,00 (61-120d). Foi observada perda de US\$ 55,00 para o tratamento de animais que se encontravam no final da lactação (121-305d), a qual foi atribuída ao elevado custo de reposição dos animais descartados, bem como a produção de leite insuficiente no final da lactação para compensação dos custos com o tratamento. De acordo com os autores, uma alternativa ao tratamento de vacas infectadas por *S. agalactiae* no final da lactação seria a secagem ou descarte dos animais. O número de lactações não apresentou efeito no modelo de benefício/custo do tratamento. Contudo, o trabalho desenvolvido por Yamagata et al. (1987) não avaliou o benefício da redução da incidência dos casos de mastite subclínica e clínica causada por *S. agalactiae*, uma vez que um animal não tratado ou refratário ao tratamento representa um reservatório e fonte de infecção para animais saudáveis. Portanto, pode-se esperar que os benefícios econômicos sejam ainda maiores do que os relatados.

Erskine e Eberhart (1990) avaliaram o custo benefício da “blitz-terapia” em 12 rebanhos com mais de 25% das vacas infectadas com *S. agalactiae* e média de CCS do tanque dos últimos 12 meses > 700.000 células/mL. Os animais positivos tiveram os quatro quartos tratados com um produto intramamário contendo 150 mg de novobiocina e 100.000 UI de penicilina G procaína (duas infusões com intervalo de 24 h) no início do estudo e após 30 dias da primeira administração. Exames microbiológicos do leite foram realizadas no 1º e 30º dia de visita nas fazendas para identificação e tratamento dos animais infectados, e 12 meses após a primeira visita para avaliação do programa de

erradicação. A média de produção de leite e de gordura no leite no primeiro ano após o tratamento aumentaram 577 Kg e 15 Kg, respectivamente, em comparação ao início do estudo. A taxa de renda/custo foi estimada por três métodos diferentes de identificação dos quartos e animais positivos: 1) exame microbiológico do leite de todos os animais seguido de tratamento dos infectados (US\$ 2,28/1); 2) tratamento de todos os animais com escore linear de CCS ≥ 4 independentemente do *status* microbiológico (US\$ 2,18/1); e, 3) tratamento de todos os animais independentemente do escore de CCS ou *status* microbiológico (US\$ 1,26/1).

No tratamento da mastite é importante considerar que alguns fatores podem interferir na chance de cura dos animais, tais como: 1) o patógeno envolvido na infecção; 2) a duração da infecção (cronicidade, pois quanto maior a cronicidade menor a chance de cura); 3) a duração do tratamento (padrão ou estendido, pois quanto mais longo o tempo de tratamento maior a chance de cura); 4) o número de quartos afetados (quanto mais quartos afetados menor a chance de cura) (SOL et al., 1994, 1997; DELUYKER; CHESTER; VAN OYE, 1999); 5) a paridade do animal (primeira, segunda ou mais de três parições. Novilhas apresentam maiores chances de cura do que vacas mais velhas); e, 6) o ciclo da lactação (lactação ou período seco, com aumento nas chances de cura nos tratamentos realizados no início do período seco) (BRADLEY; HUXLEY; GREEN, 2003). Em infecções por *S. agalactiae* outros fatores epidemiológicos importantes que também podem afetar no desfecho do tratamento são a prevalência inicial do rebanho e a taxa de novas infecções (incidência) (WEAVER et al., 1986).

2.4 PREVENÇÃO, CONTROLE E ERRADICAÇÃO

2.4.1 PRÁTICAS DE MANEJO

Os primeiros programas de controle de mastite desenvolvidos no final da década de 1960 e início da década de 1970 eram focados em patógenos contagiosos Gram-positivos, primariamente em *S. agalactiae* e *S. aureus* (KEEFE, 2012). O programa de 5 pontos de controle de mastite do Reino Unido (NEAVE et al., 1969), posteriormente expandido para o programa de 10 pontos dos Estados Unidos da América (EUA) (NMC, 2015c), têm sido efetivos no controle de patógenos contagiosos, desde que implantados de modo consciente e rigoroso.

Os princípios básicos do programa de 10 pontos do NMC são: 1) estabelecimento de objetivos para a saúde do úbere; 2) manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável;

3) procedimentos de ordenha adequados; 4) uso e manutenção adequada do equipamento de ordenha; 5) manutenção de bons registros da propriedade; 6) manejo adequado de casos de mastite clínica durante a lactação; 7) manejo eficaz das vacas secas; 8) manutenção de biossegurança para patógenos contagiosos com destino adequado dos animais infectados cronicamente; 9) monitoramento regular do *status* da saúde do úbere; e, 10) revisão periódica do programa de controle de mastite (NMC, 2015c). Atualmente, índices de controle de rebanhos bem manejados que podem ser utilizados como referência são: CCS do tanque abaixo de 150.000 células/mL, prevalência de infecções crônicas (CCS individuais > 200.000 células/mL em dois testes consecutivos) menor do que 5%, e incidência de novas infecções intramamárias (aumento da CCS individual de < 200.000 células/mL para valores maiores do que este ponto de corte) menor do que 5% por mês (SCHUKKEN et al., 2008).

2.4.2 TERAPIA EM BLITZ (“BLITZ-TERAPIA”)

O controle e erradicação de *S. agalactiae* pode ser realizado basicamente por meio de dois programas de manejo diferentes. O primeiro é baseado na realização de um *pós-dipping* eficiente concomitantemente ao tratamento de todos os animais na secagem (terapia da vaca seca) independentemente do *status* de infecção. O segundo baseia-se em programa agressivo de diagnóstico e tratamento sistemático dos animais infectados, denominado “blitz-terapia” (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003).

O sistema baseado no *pós-dipping* e tratamento da vaca seca é de fácil implementação e é considerado o mais econômico. Este sistema reduz a taxa de transmissão entre os animais (redução da incidência) e, a longo prazo, reduz a prevalência de infecção por *S. agalactiae*. No entanto, o sucesso está relacionado diretamente à implementação adequada dessas técnicas de manejo (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003). A grande desvantagem deste sistema é o longo período necessário para erradicação de *S. agalactiae*, o qual pode levar de 1 a 2 anos quando os métodos são aplicados de maneira eficiente. Como os resultados efetivos deste método demoram a ser observados, pode haver desmotivação do proprietário e ordenhadores. Ainda, o longo período de infecção dos animais com *S. agalactiae* geram perdas na produção de leite (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003).

O sistema baseado no diagnóstico e tratamento sistemático dos animais infectados (“blitz-terapia”) é realizado de maneira complementar ao *pós-dipping* e terapia da vaca seca. A grande vantagem da “blitz-terapia” é a rápida redução na prevalência de infecções

por *S. agalactiae*, quando comparado a um programa que envolva somente a adoção do pós-dipping e da terapia da vaca seca (ERSKINE e EBERHART, 1990). A desvantagem deste sistema está no alto custo inicial, reduzindo temporariamente o faturamento do produtor com a venda de leite no mês de implantação. Os principais gastos estão relacionados à coleta e ao exame microbiológico de amostras de leite, compra de medicamentos e descarte de leite. Além disso, há maior risco de ocorrência de resíduos de antimicrobiano no leite do tanque. No entanto, se a “blitz-terapia” for realizada adequadamente pode-se atingir a erradicação de *S. agalactiae* nos rebanhos de forma rápida, efetiva e economicamente viável (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003).

Em um sistema de “blitz-terapia” o diagnóstico dos animais deve ser realizado de forma estratégica, possuir o menor custo possível e ser realizado por meio de testes que apresentem acurácia adequada, que permita a identificação correta dos animais infectados (KEEFE, 1997). Neste cenário, a CCS e o exame microbiológico rotineiros de vacas individuais tornam-se uma estratégia plausível. A triagem dos animais que serão selecionados para exame microbiológico por meio da CCS reduz o número de amostras encaminhadas para o laboratório (ERSKINE, 1992). Caso nenhum método de triagem for utilizado, recomenda-se a amostragem e exame microbiológico de todo o rebanho, seguido de exames microbiológicos sequenciais do leite dos animais tratados, e exames adicionais de todo o rebanho para o monitoramento.

Além disso, o exame microbiológico do leite de todas as vacas recém paridas ou recém adquiridas é recomendada para manter o rebanho livre de infecção (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003). Neste sistema, recomenda-se que os animais não responsivos ao tratamento (cerca de 5%) sejam descartados após duas rodadas de tratamento sem sucesso. Esta medida evita a disseminação de *S. agalactiae* no rebanho, reduzindo novas infecções de animais sadios e reinfecções dos animais tratados e curados (KEEFE, 2012; NMC, 2015c). Vacas não responsivas ao primeiro tratamento e não identificadas em diagnósticos subsequentes irão se tornar reservatórios no rebanho e podem dificultar o sucesso da erradicação (KEEFE, 2012).

A escolha do melhor sistema de controle e erradicação depende da prevalência inicial de *S. agalactiae* no rebanho. Em casos de alta prevalência, a “blitz-terapia” pode ser necessária para reduzir rapidamente a CCS do tanque e possibilitar o retorno do leite a condições legais de comercialização. Além disso, em rebanhos livres de *S. agalactiae*, nos quais a infecção seja re-emergente, a “blitz-terapia” torna-se pertinente para impedir a rápida disseminação do patógeno entre os animais (FARNSWORTH; STEWART;

REID, 2003). É importante ressaltar que falhas na implementação e manutenção do pós-*dipping* adequado (cobertura de todo o teto pelo antisséptico em todas as ordenhas) e da terapia da vaca seca (tratamento de todos os animais na secagem independentemente do *status* sanitário) podem inviabilizar o programa de erradicação de *S. agalactiae*, levando a altos gastos com medicamentos e descarte de leite com consequente frustração do produtor (ERSKINE, 1992).

De acordo com Erskine (1992), todo programa de erradicação deve iniciar-se com uma orientação aos proprietários e ordenhadores concentrada em práticas de manejo que são fundamentais para prevenir a transmissão de *S. agalactiae* entre os animais, tais quais o pós-*dipping* e a terapia da vaca seca. Somente quando estas práticas estiverem bem estabelecidas deve-se iniciar as rodadas de tratamento dos animais. Neste momento é importante dispender grande esforço na orientação quanto às práticas adequadas de higiene de tratamento, pois a implementação da “blitz-terapia” tem sido associada a alta incidência de mastite fúngica iatrogênica, devido a higienização inadequada dos tetos antes da administração de antimicrobianos intramamários. Edmondson (2010) relatou que quatro semanas após a implementação de “blitz-terapia” em 200 vacas para controle de *S. agalactiae* foram identificados 17 animais com infecção intramamária causada por fungos. Neste caso, a antissepsia dos tetos não foi realizada de maneira adequada antes dos tratamentos, sendo necessário o descarte de 15 animais por infecções fúngicas não responsivas ao tratamento.

Após a erradicação de *S. agalactiae* do rebanho, medidas de controle e monitoramento devem ser implementadas para garantir que os animais estejam realmente livres do patógeno, além de prevenir novas reinfecções. O exame microbiológico mensal do leite do tanque deve ser realizado por pelo menos seis meses após a última rodada de tratamento (NMC, 2015c). Outra medida importante seria evitar a introdução de novos animais sem testes de diagnóstico de mastite, pois surtos causados por *S. agalactiae* ocorrem frequentemente após a compra de animais. É importante que vacas secas e novilhas também sejam incluídas no programa de coleta de amostras e diagnóstico, uma vez que podem representar uma fonte de reintrodução do patógeno no rebanho. Bezerras alimentadas com leite de descarte sem nenhum tratamento específico (pasteurização, acidificação, fervura) podem apresentar o comportamento de mamada cruzada, disseminando o patógeno entre os animais do plantel. Quando estes animais se tornarem lactantes (novilhas) podem reintroduzir *S. agalactiae* no rebanho (NMC, 2015c).

Dois estudos citados anteriormente foram realizados para avaliar a eficácia da “blitz-terapia” na erradicação de *S. agalactiae*. Yamagata et al. (1987), em estudo de caso-controle híbrido, realizaram “blitz-terapia” com administração de penicilina ou penicilina com novobiocina e descreveram que 97 de 99 vacas infectadas do rebanho (N = 627) foram curadas após o tratamento com um dos dois protocolos (taxa de cura de 98%). Em outro estudo, Erskine e Eberhart (1990) realizaram “blitz-terapia” em 12 rebanhos com mais de 25% das vacas infectadas por *S. agalactiae*, reduzindo a média inicial da CCS do leite do tanque de 918.000 para 439.000 células/mL em 30 dias. E, com a implementação adequada de pós-*dipping* e terapia da vaca, CCS foi reduzida para uma média de 268.000 células/mL em um ano.

É interessante notar que a implementação de premiações e penalidades pelas indústrias de laticínios baseados na CCS do leite do tanque são medidas que podem incentivar os produtores a adotar técnicas básicas de controle de patógenos contagiosos (BARKEMA et al., 2009). Keefe (1997) observou menor prevalência de *S. agalactiae* em rebanhos de produtores que recebiam pagamento por qualidade do leite, quando comparados a rebanhos de produtores do mesmo estado que não participavam de programas de bonificações.

2.4.3 “BLITZ-TERAPIA” MODIFICADA

A “blitz-terapia” tradicional é baseada na identificação e tratamento sistemático dos animais. O elevado custo com o diagnóstico inicial, compra de medicamentos e descarte de leite pode desestimular alguns produtores a aderir aos programas de erradicação baseados nesta técnica. Pequenos e médios produtores são aqueles com maiores dificuldades na implementação destes programas, principalmente quando não há bonificações pagas pela melhoria na qualidade do leite. Neste cenário, é importante conscientizar os produtores quanto a redução na produção de leite dos animais infectados e oferecer métodos alternativos de erradicação.

A “blitz-terapia” modificada baseia-se na substituição do exame microbiológico por métodos diagnósticos mais baratos, tais como a CCS ou o CMT, para identificação e tratamento de animais possivelmente infectados com *S. agalactiae*. De modo similar aos programas tradicionais, a implementação de práticas preventivas de manejo é fundamental para o sucesso da “blitz-terapia” modificada. Em relato de caso foi adotado programa de “blitz-terapia” modificada em rebanho com produção sazonal de leite sabidamente infectado com *S. agalactiae*. Inicialmente os animais foram divididos em

dois lotes com base na CCS (ponto de corte de 500.000 células/mL), e aqueles com alta CCS foram tratados em todos os quartos com 300 mg de eritromicina intramamária. Subsequentemente, quando o rebanho alcançou o menor número de animais em lactação no ano, todos os quartos de todos animais em lactação foram tratados com o mesmo protocolo terapêutico. Ao final, o exame microbiológico de todo o rebanho demonstrou que nenhum animal foi positivo para *S. agalactiae*. O benefício/custo deste programa modificado foi de US\$ 1,41/1 (EDMONDSON, 1989).

Apesar dos menores custos de implementação da “blitz-terapia” modificada, falhas na identificação de animais infectados (falso-negativos) podem comprometer a erradicação de *S. agalactiae* do rebanho uma vez que estes podem atuar como reservatórios e fonte de infecção para animais saudáveis. Por outro lado, animais positivos à CCS ou ao CMT, mas infectados com outros patógenos, seriam tratados desnecessariamente, aumentando o custo de erradicação de *S. agalactiae* e exposição desnecessária dos animais a antimicrobianos.

2.4.4 PROGRAMAS EM NÍVEL REGIONAL OU NACIONAL

Os programas de controle e erradicação de *S. agalactiae* realizados em países desenvolvidos fornecem informações importantes para indústrias leiteiras emergentes, principalmente com relação às dificuldades de implementação e pontos críticos para o sucesso. Um dos pioneiros em programas de erradicação de *S. agalactiae* foram os EUA. Em 1945, o estado de Connecticut iniciou o primeiro programa para identificação e erradicação de *S. agalactiae* (MORSE, 1977). No ano seguinte, o Estado de New York iniciou o “Programa de Controle de Mastite do Estado de Nova York”, com foco na erradicação de patógenos contagiosos. Entre 1946 e 1960 este programa já havia testado mais de 1 milhão de animais (MORSE, 1977).

De acordo com o Serviço Veterinário Dinamarquês, em 1950 cerca de 30 a 40% dos 184.000 rebanhos produtores continham animais infectados com *S. agalactiae* (ANDERSEN et al., 2003). Devido à alta prevalência deste patógeno um programa de controle nacional foi criado em 1955, com subsídio de aproximadamente \$1,2 milhões. O programa era embasado na identificação bacteriológica, tratamento e descarte dos animais positivos, associado à adoção de medidas rigorosas de higiene e verificação regular do sistema de ordenha. Além disso, nos rebanhos que continham animais infectados com *S. agalactiae*, os produtores foram proibidos de vender vacas ou novilhas prenhes (ANDERSEN et al., 2003). Inicialmente, a adesão foi compulsória, estimando-

se participação de aproximadamente 81% dos 60.000 rebanhos positivos (cerca de 1.200.000 de vacas).

Após a implementação do programa o número de rebanhos positivos para *S. agalactiae* diminuiu de 30-40% para 20,5%, com uma estimativa de 0,6% de animais positivos para *S. agalactiae* (MORSE, 1977). A partir de 1988 o programa tornou-se voluntário, embora a proibição na venda de animais de rebanhos infectados tenha sido mantida (ANDERSEN et al., 2003). Em 1992, a prevalência de *S. agalactiae* nos rebanhos dinamarqueses foi estimada em 2%, com incidência em nível de rebanho de 1 a 2% (MWEU et al., 2014). Após a redução na prevalência foi estabelecido um programa de vigilância, no qual rebanhos identificados como positivos eram submetidos a amostragem de todos os animais, seguida por um programa de tratamento e descarte de animais infectados (AGGER et al., 1994). Entre 1992 e 2000, os resultados do programa de vigilância dinamarquês demonstraram uma incidência de 0,4 a 1,1% de novos rebanhos infectados com *S. agalactiae*, sugerindo-se possível re-emergência do patógeno na população de rebanhos leiteiros (ANDERSEN et al., 2003).

No Reino Unido um programa de controle de patógenos contagiosos causadores de mastite foi implementado no final de 1960, embasado na adoção de 5 pontos de controle de mastite (NEAVE et al., 1969). Em Israel foi adotado um programa de erradicação de *S. agalactiae* descentralizado, no qual laboratórios regionalizados responsabilizavam-se pela implementação, manutenção e vigilância do programa nos rebanhos leiteiros. Os rebanhos eram avaliados mensalmente por meio da coleta de amostras de leite do tanque. Caso um rebanho fosse considerado positivo, todos os animais eram amostrados para realização de exame microbiológico. Vacas positivas eram tratadas em esquema de “blitz-terapia” e descartadas quando não responsivas. Na região de um laboratório específico foi observada uma redução na prevalência de rebanhos contendo animais infectados com *S. agalactiae* de 28 para menos de 2% em um período de cinco anos após a implementação do programa (KEEFE, 1997).

Tabela 1. Taxas de cura microbiológica da mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae* com diferentes protocolos de tratamento

Autor(es), Ano e Local	Tipo Estudo	Número Rebanhos	Tratamento	Via Administração ¹	Posologia	Avaliação de cura	Nível	Taxa de Cura	Comentário
Devis et al., 1975; EUA: New York	Ensaio Clínico	SI ²	Cloxacilina Sódica 300 mg	IMM	3 vezes intervalo de 3 ordenhas	21 dias	Quarto	91% (51/56) Mastite Clínica 92% (68/74) Mastite Subclínica	
Weaver et al., 1986; EUA: California	Ensaio Clínico	3	100.000 UI de penicilina G procaína + 150 mg novobiocin	IMM	2 vezes intervalo de 24h	21 a 25 dias	Vaca	94% (87/92)	
			1,2 milhões de UI de penicilina G procaína + 10mL de sol. salina estéril	IMM	2 vezes intervalo de 24h			87% (117/136)	
Yamagata et al., 1987; EUA: California	Caso- Controle Híbrido	SI	Penicilina 106 UI	IMM	Não especificado	21dias	Vaca	98% (97/98)	Terapêutica adotada em programa de “blitz-terapia” (avaliação econômica)
			Penicilina 105 UI + 150 mg novobiocin	IMM					
Erskine e Eberhart, 1990; EUA: Pennsylvania	Ensaio Clínico	SI	100.000 UI de penicilina G procaína + 150 mg novobiocin	IMM	2 vezes intervalo de 24h	30 dias	Quarto	92,6% (281/305)	Terapêutica adotada em um programa de “blitz-terapia”
							Vaca	88,3% (120/137)	

Tabela 1. Continuação.

Autor(es), Ano e Local	Tipo Estudo	N Rebanhos	Tratamento	Via Administração¹	Posologia	Avaliação de cura	Nível	Taxa de Cura	Comentário
Wilson et al., 1992; Reino Unido	Ensaio Clínico	16	Cloxacilina Sódica 0,2 g de liberação lenta	IMM	3 vezes intervalo de 48h	21 e 28 dias	Quarto	100% (21/21)	
			Cloxacilina Sódica 0,6 g de liberação lenta	IMM	3 vezes intervalo de 48h			100% (29/29)	
			Cloxacilina Sódica 0,2 g de liberação rápida	IMM	3 vezes intervalo de 48h			100% (22/22)	
			Cloxacilina Sódica 0,6 g de liberação rápida	IMM	3 vezes intervalo de 48h			100% (28/28)	
Wilson et al., 1999; EUA: New York e Nordeste da Pennsylvania	Estudo Retrospectivo	SI	Amoxicilina	IMM	Não especificado	30 dias	Não especificado	86% (709/829)	Somente Pirlimicina não foi significativamente diferente do grupo não tratado.
			Cefapirina	IMM				66% (115/175)	
			Cloxacilina	IMM				77% (376/487)	
			Eritromicina	IMM				81% (78/96)	
			Hetacilina	IMM				62% (28/45)	
			Penicilina	IMM				63% (139/222)	
			Pirlimicina	IMM				44% (32/73)	
			Combinado	IMM				77% (1477/1927)	
			Não tratado	-				27% (31/116)	

Tabela 1. Continuação.

Autor(es), Ano e Local	Tipo Estudo	N Rebanhos	Tratamento	Via Administração¹	Posologia	Avaliação de cura	Nível	Taxa de Cura	Comentário
Reyes et al., 2015; Colombia	Ensaio Clínico	17	Cloxacilina 200mg + Ampicilina 75mg	IMM	3 vezes intervalo de 24h	30 dias	Vaca	82,4% (103/125)	
			Hidroideto de panetamato 5g	IM	3 vezes intervalo de 24h			65,85% (81/123)	

¹ IMM = intramamário e IM = intramuscular.

² SI = sem informação.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser enviado para revista *Journal of Dairy Science*

(Normas de publicação – ANEXO I)

Efficacy of cefquinome and cloxacillin for treatment of *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis

Rodolfo S. Rossi,* Letícia B. N. Correia,* Simony T. Guerra,* Vera L. M. Rall,† José C. F. Pantoja*¹

*Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, 18618-681.

†Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP – Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, 18618-681.

¹ Corresponding author: pantoja@fmvz.unesp.br

ABSTRACT

A randomized clinical trial was conducted to assess the efficacy of intramammary (IMM) cloxacillin (CLOXIMM), IMM cefquinome (CEFIMM), and intramuscular cefquinome (CEFIM) to treat *S. agalactiae* intramammary infections (IMI) (objective 1). Subsequently, 2 arms of the trial (CLOXIMM and CEFIMM) were extended to assess whether the treatment of *S. agalactiae* IMI with CLOXIMM is non-inferior to the treatment with CEFIMM (objective 2). Nine farms were included in the study. Initially milk samples were collected from all quarters of all lactating cows for microbiological identification of *S. agalactiae*. Positive cows were randomly allocated into 4 groups: CLOXIMM, CEFIMM, CEFIM, and negative control (CONTROL). The primary outcome of interest was bacteriological cure at D14 (CURE14), D21 (CURE21), and D14 and D21 (CURE1421) after the beginning of the treatments. Logistic regression was used to estimate the odds of cure between each treatment and CONTROL. Non-inferiority analysis was performed considering a one-sided 95% confidence interval (CI) and non-inferiority margins of 0.10, 0.15, 0.20, and 0.25. Of the total number of cows (N = 457) and quarters (N = 1,829) screened, 30 and 16% were infected with *S. agalactiae*, respectively. A total of 241 infected quarters were included in the study. The adjusted *S. agalactiae* bacteriological cure for CLOXIMM, CEFIMM, CEFIM, and CONTROL was 86, 98, 55, and 25% at D14; 82, 93, 52, and 0% at D21; and 82, 93, 52, and 0% at D1421, respectively. Adjusted CURE14 was 98.0% and 85.9% for quarters treated with CEFIMM and CLOXIMM, respectively, resulting in a difference of 12.1 percentage points (95% CI: 0.056 - 0.184). The CLOXIMM was considered non-inferior to CEFIMM when non-inferiority margins of 0.20 and 0.25 were adopted, nevertheless the determination of non-inferiority was inconclusive for margins of 0.10 and 0.15. Results of this study demonstrated that both CLOXIMM and CEFIMM are highly effective to treat *S.*

agalactiae IMI when administered intramammarily. The low CEFIM cure rate suggests that its use cannot be justified in “blitz-therapy” programs. Veterinarians should ponder whether the higher CEFIMM cure rate (12 percentage points higher than CLOXIMM) would be acceptable in *S. agalactiae* eradication programs, at the cost of using a fourth-generation cephalosporin that is listed as critically important for human use.

Key words: milk quality, intramammary infection, clinical trial, non-inferiority, intramuscular treatment.

INTRODUCTION

Control of contagious mastitis caused by *Streptococcus agalactiae* is still challenging in many dairy regions of the world. Reported prevalences at the cow level ranged from 7.1% in Thailand (Leelahapongsathon et al., 2014), 16% in China (Yang et al., 2013), to 27-35% in Colômbia (Ramírez et al., 2014; Reyes et al., 2015). In Brazil, herd and cow level prevalences have been reported as high as 60% (Brito et al., 1999), and 21% (Souza et al., 2009), respectively. Moreover, a reemergence of *S. agalactiae* has been observed in countries that had long adopted contagious mastitis control programs. Katholm et al. (2012) reported that the herd prevalence of *S. agalactiae* increased from 2 to 6.1% in Denmark between 2000 and 2009.

Intramammary infections (**IMI**) caused by *S. agalactiae* result in economic losses to farmers and dairy industries. Infected cows experience milk production losses of 1.6 - 4.5 Kg/dia (Natzke et al., 1972; Wilson et al. 1997). Infected cows can shed up to 10^7 bacteria/mL (Guterbock and Blackmer, 1984) and an average of 2,238,000 cells/mL in their milk (Erskine, 1992), which depreciates the milk price. Additional economic losses result from recurrent episodes of clinical mastitis experienced by chronically infected cows (Leelahapongsathon et al., 2014). From the industrial standpoint, *S. agalactiae* IMI results in raw milk alterations, such as increased rate of lipolysis and proteolysis (Ma et al., 2000; Akerstedt et al., 2012), which negatively affect its industrial quality, yield, and shelf life.

Historically, the implementation of mastitis control programs for eradication of contagious mastitis resulted in a drastic decrease in the prevalence of *S. agalactiae* in developed dairy regions (Keefe, 2012). A treatment approach named “blitz-therapy” was the basis of such programs and consists of systematic identification and simultaneous treatment of all infected cows (Keefe, 1997). Several researches have

demonstrated that “blitz-therapy” is economic viable when used in *S. agalactiae* eradication programs (Yamagata et al., 1987; Edmondson, 1989; Erskine e Eberhart, 1990). Traditionally, once cows are diagnosed with *S. agalactiae* by means of microbiological examination of composite milk samples, all quarters of all infected animals are treated simultaneously with natural or semi-synthetic penicilins, such as cloxacillin (Farnsworth et al., 2003). Bacteriological cure rates of 77-100% have been reported following intramammary (**IMM**) treatment with those drugs (Wilson et al., 1972; Davis et al., 1975; Erskine and Eberhart, 1990; Weaver et al., 1986; Wilson et al., 1999; Reyes et al., 2015).

In Brazil, the use of cephalosporins is common in “blitz-therapy” programs. Cefquinome is a fourth-generation cephalosporin characterized by a broad-spectrum and stability against penicilinases and beta-lactamases (European Medicines Agency, 1995), and is available for IMM and intramuscular (**IM**) administration for mastitis treatment. Possible advantages are the short treatment duration (1.5 d for IMM use) and milk withdrawal period (60 and 12 h after the last IMM or IM administration, respectively). Cefquinome is also recommended by some manufacturers for mastitis systemic treatment, although little research has demonstrated its ability to reach proper concentrations within the mammary tissue (Ehinger et al., 2006). Systemic treatment of *S. agalactiae* subclinical mastitis with cefquinome has been appealing to farmers because treating multiple infected quarters with a single course of IM treatment could be more cost-effective than using several IMM tubes.

Nonetheless, fourth generation cephalosporins should be used with caution in livestock animals, to prevent de development of resistant bacterial strains. Cefquinome is listed by the World Health Organization as critical for human use (World Health

Organization, 2012) and its use in farm animals can be avoided if other traditional drugs, such as cloxacillin, are as efficient to treat *S. agalactiae* IMI.

In this context, the objectives of this study were: 1) to assess the efficacy of IMM cloxacillin (**CLOXIMM**), IMM cefquinome (**CEFIMM**), and IM cefquinome (**CEFIM**) to treat *S. agalactiae* IMI; and 2) to assess whether the treatment efficacy of *S. agalactiae* IMI with CLOXIMM is non-inferior to the treatment with CEFIMM.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the UNESP's Ethics Committee for Animal Use, protocol 07/2015.

Study design

A parallel, non-blinded randomized clinical trial was conducted to estimate the efficacy of CLOXIMM, CEFIMM, and CEFIM, as compared with a negative control group (**CONTROL**), to treat *S. agalactiae* IMI (objective 1). Subsequently, 2 arms of the trial (CLOXIMM and CEFIMM) were extended to achieve the required sample size needed to test the non-inferiority hypothesis proposed in objective 2.

Inclusion and exclusion criteria for herds and cows

Herds were eligible to participate if located in Sao Paulo or Minas Gerais states, Brazil, had bulk tank milk somatic cell count (**SCC**) > 700.000 cells/mL on the last official test day), had *S. agalactiae* isolated from the bulk tank milk, milked > 20 lactating Holsteins or Holstein crossbreed cows, milked cows with milking machines, and offered voluntary cooperation to perform the proposed activities.

Cows were eligible for inclusion if had ≥ 1 quarter infected with *S. agalactiae*, had a unique identification, were apparently healthy, and had not received any antimicrobial treatment within 15 d prior to inclusion in the study. Cows were excluded from the study if developed any disease after inclusion, died, left the herd for any reason, or received any antimicrobial treatment between the first *S. agalactiae* diagnosis (screening day) and beginning of any experimental treatment.

Sampling strategy

Field representatives of known dairy processors or cooperatives were asked to make a list of herds that attended the inclusion criteria (except for the isolation of *S. agalactiae* from the bulk tank milk). All farms that attended the inclusion criteria and demonstrated interest in participating in the study were included in the study. Initially, 4 farms were included to accomplish objective 1, and 5 additional farms were included to accomplish objective 2. Farms were first visited to explain the study protocol and obtain informed consent. Farms were then revisited (**D0**) and aseptic milk samples (15 mL) were collected from all quarters of all lactating cows for microbiological screening of *S. agalactiae* IMI and SCC. All cows who met the inclusion criteria were then randomly assigned to the study groups.

Randomization

For objective 1, cows with ≥ 1 quarter infected with *S. agalactiae* were randomly allocated into 1 of 4 groups, such that all infected quarters within a cow received the same treatment protocol. Within each participant herd, eligible cows were stratified by parity (1 or > 1 lactations) and within each parity stratum, blocked randomization (Friedman et al., 1998) was used to allocate cows into the study groups.

Blocks of 7 animals were formed and within each block, 2 cows were randomly allocated into 1 of the treated groups (CLOXIMM, CEFIMM, or CEFIM), and 1 cow was allocated into CONTROL. The CONTROL group had fewer cows than the treated groups to minimize the risk of *S. agalactiae* transmission between quarters and cows during the course of the study.

For objective 2, 5 additional herds were included to extend 2 arms of the trial (CLOXIMM and CEFIMM) and reach the required sample size. Except for the block size (2 cows), cows were allocated into CLOXIMM or CEFIMM, following the randomization procedure previously described. Although a smaller sample size was required for objective 1, data from the 9 farms were used in the analysis.

Treatments and follow-up sampling

Treatments were administered upon completion of *S. agalactiae* microbiological diagnosis, attempting not to exceed 7 d from D0. Cows in CLOXIMM (N = 94 quarters of 48 cows) received an IMM infusion containing 250 mg of cloxacillin and 125 mg of ampicillin (Intramast, Vallée, Sao Paulo, Brazil) every 24 h, for 3 d. Cows in CEFIMM (N = 100 quarters of 47 cows) received an IMM infusion containing 75 mg of cefquinome (Cobactan VL, MSD Animal Health, Sao Paulo, Brazil) every 12 h, for 1.5 d (3 consecutive milkings). Cows in CEFIM (N = 31 quarters of 12 cows) received an IM injection of cefquinome (1 mg/kg) (MSD Animal Health, Sao Paulo, Brazil) every 24 h, for 3 d. Cows in the control group did not receive any treatment or placebo. Milk of treated animals was discarded following label directions, for 72, 60, and 12 h after the last treatment with CLOXIMM, CEFIMM, and CEFIM, respectively.

Treatments were initially performed by the authors (first milking) and were continued until completion by trained farm personnel. After milking of each animal, the

teat end was scrubbed with a cotton pad moistened with 70° alcohol. After IMM infusion, the teat and the quarter were massaged in an ascending direction to improve the distribution of the drug within the mammary gland. Intramuscular injections were performed in the caudal thigh muscles (semimembranosus or semitendinosus), after antisepsis of the skin.

Duplicate aseptic milk samples were collected by study personnel from all enrolled quarters at 14 ± 2 (**D14**) and 21 ± 2 (**D21**) d after the beginning of the treatments, for microbiological examination and SCC. For the CONTROL group, samples were collected on the same days. Production data, such as parity, days in milk (**DIM**), and milk production were recorded.

Farmers and milking technicians were trained to improve their milking routines and prevent transmission of *S. agalactiae* during the study. The training was based on the NMC's 5-point mastitis control plan (Neave et al., 1969). The main recommendations were segregation of infected cows in a separate milking group (milked always last), wearing of gloves, use of validated pre- and post-dipping solutions, and drying of teats with disposable paper towels.

Microbiological examination of milk and somatic cell count

Milk samples were processed at UNESP's Mastitis Research and Diagnosis Laboratory, within 24 h of collection. Milk samples were examined according to the NMC's procedures (NMC, 1999). Ten μL of milk were streaked onto a quadrant of a blood agar plate and incubated at 36 °C. Samples were read at 24, 48 and 72 h. An IMI was defined as the presence of pure growth of ≥ 3 similar colonies on the plate. Samples were considered negative when there were ≤ 2 similar colonies on the plate, and contaminated when there were ≥ 3 types of colonies on the plate.

When 1 of the duplicate milk samples collected on D14 or D21 was contaminated, the other sample was used for analysis. When one of the duplicate samples was positive for *S. agalactiae* and the other was negative, an IMI was confirmed based on the positive result.

Diagnosis of *S. agalactiae* was performed based on phenotypic identification of colonies, Gram staining and further biochemical tests. Positive samples were Gram-positive cocci, catalase-negative, aesculin and bile aesculin-negative, and CAMP-positive.

The Somaticell (Madasa, Sao Paulo, Brazil) was used to estimate SCC in milk samples collected on D0, D14, and D21, following the manufacturer's instructions. Two mL of reagent and milk were mixed in a plastic tube and homogenized for 30 s. The tube was then held upside down for 30s for draining of the solution, and the reading (cells/mL) was performed using the scale on the tube's wall.

Study outcomes

The primary outcome was the bacteriological cure, defined as the isolation of *S. agalactiae* at D0, followed by a negative culture result (or the isolation of a different pathogen) at D14 (**CURE14**), D21(**CURE21**), and D14 and D21 (**CURE1421**). The secondary outcome was SCC.

Sample size calculations

For objective 1, the sample size calculation was performed to detect a difference between proportions and demonstrate that the proportion of bacteriological cure for each treatment was greater than that of CONTROL. Calculations were performed assuming $\alpha = 0.05$, statistical power = 0.8, expected proportion of cure after IMM

therapy = 0.8 for the treated groups, and 0.2 for CONTROL (Weaver et al., 1986; Wilson et al., 1999; Reyes et al., 2015). Based on these assumptions, at least 10 quarters per group were required.

An adjustment was made to the sample size to consider the smaller size of CONTROL (Whitley and Ball, 2002). The calculation was performed considering a ratio of 2:1 between treated and control quarters, maintaining the same statistical power of 0.8. In the final estimate, at least 30 treated quarters per group and 15 control quarters were required to accomplish the analytical objective.

For objective 2 (non-inferiority test), the sample size was determined based on a 95% confidence interval (CI) for the difference between the treatments (CLOXIMM and CEFIMM), in relation to the non-inferiority margin (Δ) and the null effect margin (difference between the treatments = 0) (Piaggio et al., 2006). The sample size was calculated assuming $\alpha = 0.05$, statistical power = 0.80, proportion of bacteriological cure for both CLOXIMM and CEFIMM = 0.90 (based on a pilot study; Rossi and Pantoja, 2015) and $\Delta = 0.15$ (Schukken and Deluyker, 1995; Schukken et al., 2013). Based on these assumptions, 50 quarters per group were needed for the study. Because multiple quarters per cow could be included in the study, an adjustment (Dohoo et al., 2003a) was applied to account for the clustering of quarters within cow. Assuming an intraclass correlation of 0.28 between quarters infected with *S. agalactiae* within the same cow (Barkema et al., 1997), 92 quarters per group were needed for the study.

Statistical analysis

Definitions. When milk samples could not be collected on D14 or D21, quarters were excluded from the calculations of CURE14 and CURE21, respectively. When treated

quarters exhibited clinical mastitis before D14, or between D14 and D21, and were treated by milking technicians, the “intention to treat” principle (Moher et al., 2010; Schukken et al., 2013) was applied and a treatment failure was considered.

Treatment efficacy was defined as the bacteriological cure rate difference between each treated group and CONTROL, divided by the cure rate of CONTROL (Dohoo et al., 2003b).

Analytical procedures. The analysis was performed at the quarter level. Generalized linear models using a logit link (PROC GLIMMIX, SAS Institute, Cary, NC) were constructed to estimate the chances of bacteriological cure between each treatment and the control group. Separate models were constructed for CURE14, CURE21, and CURE1421. Farm was considered a random effect. Milk yield at treatment, DIM, and number of *S. agalactiae* infected quarters per cow were included in the model as covariates and remained if significant, according to a backward variable selection procedure. Days in milk was categorized into 0-140, 141-230, and > 230 DIM, and milk yield was categorized into 0-15, 15-22, and > 22 kg/cow/d, based on the 33rd and 66th percentiles of their distributions. Parity was not included in the model because it was used to stratify the randomization. A compound symmetry covariance structure was used to model the correlation among quarters within the same cow.

For the analysis of CURE21, and CURE1421, the statistical multivariable models did not converge because the data were sparse (lack of bacteriological cure in CONTROL). Thus, this group was excluded from the analysis so that statistical comparisons could be made between the other groups.

A linear mixed model (PROC MIXED, SAS Institute, Cary, NC) was used to compare the mean post-treatment SCC (log₁₀ cells/mL) between the study groups.

Farm was considered a random effect. Milk yield at treatment, DIM and number of *S. agalactiae* infected quarters within cow were included in the model as covariates, and remained if significant, according to a backward variable selection procedure. Post-treatment SCC was excluded from the analysis when the “intention to treat” principle was used, that is, when a quarter was retreated by milking technicians with any other treatment than those in the study protocol.

The assessment of non-inferiority was performed using the adjusted CURE14 estimates derived from the generalized linear models, as described previously. The CI for the adjusted cure rate difference between CEFIMM and CLOXIMM was calculated (Schukken et al., 2013), considering a one-sided 95% CI and non-inferiority margins of 0.10, 0.15, 0.20, and 0.25. All analyses were performed at a significance level of 0.05.

RESULTS

Herd characteristics

The study was conducted in 9 commercial farms located in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, between February 2016 and May 2017. On 6 farms (A, B, C, G, H and I) cows were milked in pit parlors and on 3 farms (D, E, and F) cows were milked in stanchion parlors. Herd size ranged from 22-82 lactating cows, the herds' average milk yield was between 9.0 and 22.7 kg/cow/day, and bulk tank SCC ranged from 760,000 to 1,900,000 cells/mL (Table 1). All cows were milked twice a day and were housed in semi-confinement systems.

At D0, the prevalence of cows and quarters infected with *S. agalactiae* ranged from 15-45% and 5-25% across the herds studied, respectively (Table 1).

Completeness of the dataset

A total of 1,829 quarters of 457 cows were initially screened for *S. agalactiae* at D0. Of these, 285 quarters of 135 cows were positive for *S. agalactiae* and met the inclusion criteria. Forty-four quarters of 18 cows were excluded from all analyses. Two quarters from the same cow were excluded due to antibiotic treatment between D0 and initial treatments (herd B). Ten quarters from 3 cows in herd G and 23 quarters from 9 cows in herd H were dried off after D0, and 3 quarters from 1 cow in herd A were excluded due to lack of milk on D14 and D21. Six quarters of 4 cows in herd G were excluded because the owner refused to allow inclusion in the study (cows were knowingly infected with *Staphylococcus aureus*).

Six quarters of 4 cows were excluded from only the CURE14 analysis, of which 1 was due to lack of milk on D14 and 5 were excluded because they could not be identified (lost ear tags) on D14. Nine quarters of 5 cows were excluded from only the CURE21 analysis, of which 2 were excluded because the cow died between D14 and D21, and 7 were excluded due to lack of milk on D21.

One quarter of a cow and 3 quarters of 2 cows exhibited clinical mastitis prior to D14 and between D14 and D21, respectively, and were treated by the milking technicians. According to the "intention-to-treat principle", these 4 quarters were not excluded from the analyses. The first quarter was considered a treatment failure for CURE14, CURE21 and CURE1421, and the last 3 quarters were considered a treatment failure only for CURE21 and CURE1421.

After all exclusions, 235 quarters (113 cows) were used at D14, and 232 quarters (112 cows) were used on D21. The final number of quarters assigned to each group at each follow-up d is presented in Table 3.

Group characteristics and sampling intervals

The characteristics (parity, DIM, milk yield, and number of infected quarters per cow) of the cows after randomization into the study groups are presented in Table 2. The median interval between D0 and initial administration of treatments was 7 days. The median intervals between initial administration of treatments and the follow-up sampling days (D14 and D21) were 15 and 21 days, respectively.

Bacteriological cure

Objective 1. The overall unadjusted *S. agalactiae* bacteriological cure for CLOXIMM, CEFIMM, CEFIM, and CONTROL was 86, 98, 55, and 25% at D14; 82, 93, 52, and 0% at D21; and 82, 93, 52, and 0% at D1421, respectively (Table 3).

The adjusted *S. agalactiae* bacteriological cure rates for the study groups are presented in Table 4. Except for treatment, none of the covariates included in the multivariable model were significantly associated with the odds of CURE14 ($P > 0.05$). For CURE21 and CURE1421 treatment and number of *S. agalactiae* infected quarters per cow were significantly in the final model ($P \leq 0.01$).

Objective 2. The adjusted CURE14 was 98.0% and 85.9% for quarters treated with CEFIMM and CLOXIMM, respectively, resulting in a difference of 12.1 percentage points ($\Delta = 0.121$; 95% CI: 0.056 - 0.184; Figure 1). The CLOXIMM was considered non-inferior to CEFIMM when Δ of 0.20 and 0.25 were considered, as the upper 95% CI of the difference did not extend beyond the proposed non-inferiority margins. Nevertheless, the determination of non-inferiority was inconclusive for margins of 0.10 and 0.15 since the CI for Δ overlapped both non-inferiority and inferiority areas (Piaggio et al., 2006).

Somatic cell count

The post-treatment SCC response of quarters treated with CEFIM was not different than that of CONTROL quarters (Figure 2). In contrast, the geometric mean SCC decreased 43 and 49% (CLOXIMM) and 64 and 67% (CEFIMM) on D14 and D21, respectively ($P < 0.01$). Mean SCC was different between CLOXIMM and CEFIMM at D14 ($P < 0.03$), but not at D21 ($P > 0.05$; Figure 2).

DISCUSSION

The pressure to reduce antimicrobial use in livestock animals has increased in the last decades. Fourth-generation cephalosporins have received special attention due to its classification as critical for human use and high probability of gene resistance transmission between microorganisms (World Health Organization, 2012; European Medicines Agency, 2014). According to the European Medicines Agency (2014), this group should only be used in livestock animals when there is no alternative antimicrobial commercially available.

Results of this study demonstrated that both cefquinome (adjusted cure rate = 98%) and a combination of cloxacillin and ampicillin (adjusted cure rate = 86%) are highly effective to treat *S. agalactiae* IMI when administered intramammarily. The use of a negative control group allowed the estimation of the treatments' actual efficacy. The *S. agalactiae* cure rate after treatment with cloxacillin agrees with previous reports (98%, Kingwill et al., 1970; 100%, Wilson et al., 1972; 92%, Davis et al., 1975; 77%, Wilson et al., 1999; and 82%, Reyes et al., 2015). To our knowledge, no studies have been previously conducted to investigate the efficacy of IMM cefquinome to treat *S. agalactiae*.

The adjusted cure rate difference between CEFIMM and CLOXIMM at D14 ($\Delta = 0.121$; 95% CI: 0.056 - 0.184) was within the hypothesis that CLOXIMM is not inferior to CEFIMM considering Δ of 0.20 and 0.25. Nevertheless, the 95% CI of the difference fell outside the limits to conclude non-inferiority when Δ of 0.10 and 0.15 were considered. In non-inferiority studies, the Δ is chosen based on traditional clinical trials (with a negative control group), so that the non-inferiority margin is not greater than half of the expected effect of the treated group (Vasquez et al., 2016). Non-inferiority margins of 0.15 (Schukken et al., 2013; Vasquez et al., 2016) and 0.20 (Bryan et al., 2016) have been used in non-inferiority studies. Based on a pilot study performed by the authors (Rossi e Pantoja, 2015) the maximum non-inferiority margin adopted could be 0.35 (*S. agalactiae* bacteriological cure of 0.2 and 0.9 for negative control and treated groups, respectively).

In “blitz -therapy” programs, it should be considered that, out of 10 CLOXIMM treated quarters, approximately 1-2 would remain uncured. While such quarters could act as reservoirs of infection, bacteriological cure would be assessed within 7 d after treatment, allowing these infected quarters to be quickly identified and managed accordingly (retreated, chemically inactivated, or even culled). Thus, it should be pondered by veterinarians whether a lower cure rate (86%) using a traditional IMM drug would be acceptable in “blitz -therapy” programs, as opposed to increasing the cure rate up to 12 percentage points, at the cost of using a fourth-generation cephalosporin that is listed as critically important for human use.

Quarters treated with CEFIM experienced the least cure rate (adjusted cure rate = 55%) at D14. The use of IM therapy to treat *S. agalactiae* IMI has been appealing for cases in which multiple quarters of the same cow are affected, so that a single course of treatment would treat all quarters at the same time. However, the low CEFIM cure rate

observed here suggests that its use cannot be justified in “blitz -therapy” programs for eradication of *S. agalactiae*.

The low CEFIM cure rate could have been attributed to the insufficient penetration of cefquinome into the mammary gland. Cefquinome has a low PKa (2.5-2.9) and low liposolubility, which results in limited penetration into the mammary gland (European Medicines Agency, 1995). In contrast, Ehinger et al. (2006) suggested that cefquinome can penetrate into the mammary tissue, but the study was performed “in vitro”, after simulation of systemic administration in fresh udders removed from slaughtered lactating cows.

It could be hypothesized that the low CEFIM cure rate could have been attributed to reinfections from uncured quarters within the same cow. However, our data show that reinfections did not bias the results of the study because all possible reinfections (11 quarters that were culture-negative on D14 and positive on D21) were distributed across all study groups (5 in CEFIMM, 2 in CONTROL, 1 in CEFIM, and 3 in CLOXIMM). Besides, lower reinfection rates within the same cow would have been expected in CEFIM quarters because possible false-negative quarters at D0 would have been treated by IM injection.

Interestingly, the odds of cure for CURE21 was 5 times greater (95% CI: 1.5 - 16.6) for cows infected with 4 quarters than for cows infected with 3 quarters (Table 4). It is possible that, for cows with 3 infected quarters, new infections originating from one of these quarters occurred during the time between milk sampling at D0 and treatment. These infected quarters were probably left untreated and potentially transmitted *S. agalactiae* to the other treated and cured quarters, decreasing the odds of bacteriological cure for these cows.

Bacteriological cure has been traditionally defined as the presence of negative culture results on 2 successive post-treatment sampling days (e.g., 14 and 21 d) (McDougall et al., 2007; Schukken et al., 2011). Because there was a negative control group being managed in the herd, bacteriological cure at 14 d after the beginning of the treatment was considered the primary outcome of this study to minimize the risk of reinfection by *S. agalactiae* between days D14 and D21. The occurrence of reinfections from negative control quarters, or uncured quarters within the same mammary gland could have resulted in underestimation of the actual cure rate of the treated groups. As previously mentioned, only 11 quarters (4.5%) were negative for *S. agalactiae* at D14 and positive at D21, suggesting reinfections between D14 and D21.

The post-treatment SCC response of quarters treated with CEFIM was similar to that of CONTROL quarters, reflecting the low CEFIM cure rate (55%) and the high shedding (average of 2.2×10^6 cells/mL; Erskine, 1992) of somatic cells in milk of infected quarters. The post-treatment SCC response at D21 was not different between CLOXIMM and CEFIMM, and agrees with their respective cure rates. It is interesting to note that, despite the high cure rates observed in CLOXIMM and CEFIMM, SCC did not return to normal levels ($< 200,000$ cells/mL) at D21. This could be a result of few uncured quarters that remained in each of these groups and new IMI caused by other pathogens. It is expected that the reduction in SCC of treated and cured quarters occurs completely after 21 days of bacteriological cure (Pyorala et al., 1994).

The authors believe that results of this study can be extrapolated to a larger population of similar herds and cows as those included in the study. Our findings can be used to improve *S. agalactiae* treatment decisions at the farm level. The reported efficacy of the treatments tested here can be useful to develop decision making

economic models that will result in prevention of unnecessary exposure of cows to antimicrobials and maximize the efficiency of *S. agalactiae* eradication programs.

CONCLUSIONS

Results indicated that IMM treatment with CLOXIMM and CEFIMM resulted in greater bacteriological cure rates, as compared with CEFIM or CONTROL. The low bacteriological cure of CEFIM observed in the present study does not justify the use of CEFIM in *S. agalactiae* eradication programs. The CLOXIMM was considered non-inferior to CEFIMM when non-inferiority margins of 0.20 and 0.25 were considered. Nonetheless, determination of non-inferiority was inconclusive for the margins of 0.10 and 0.15. This finding emphasizes that traditional antimicrobials, such as cloxacillin, can be as effective as those that should be reserved for human use, such as cefquinome. Results of this study can be applied in *S. agalactiae* eradication programs and contribute to the improvement of the quality of milk and dairy products.

AKNOWLEDGMENTS

We thank the farmers and their staff for cooperating with the study. This research was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant 2015/21157-0. The scholarship (132538-2015-6) of Rodolfo S. Rossi was provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ).

REFERENCES

Akerstedt, M., E. Wredle, V. Lam, and M. Johansson. 2012. Protein degradation in bovine milk caused by *Streptococcus agalactiae*. J. Dairy Res. 79:297-303.

- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Galligan, D.T., Beiboer, M.L., Brand, A., 1997. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *J. Dairy Sci.* 80, 1592–1599.
- Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, M. T. Ribeiro, and V. M. O. Veiga. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: Exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 51:129-135.
- Bryan, M. A., S. Y. Hea, S. A. Mannering, and R. Booker. 2016. Demonstration of non-inferiority of a novel combination intramammary antimicrobial in the treatment of clinical mastitis. *New Zeal. Vet. J.* 64:337-342.
- Davis, W. T.; D. C. Maplesden, R. P. Natzke, and W. N. Philpot. 1975. Sodium cloxacillin for treatment of mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 58:1822-1827.
- Dohoo, I., Martin, W. and Stryhn, H. 2003a. Sampling. Pages 27-47 in *Veterinary epidemiologic research*. 1st ed. AVC Incorporated, Charlottetown, PE.
- Dohoo, I., Martin, W. and Stryhn, H. 2003b. Measures of association. Pages 121-138 in *Veterinary epidemiologic research*. 1st ed. AVC Incorporated, Charlottetown, PE.
- Edmondson, P. W. 1989. An economic justification of “blitz” therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. *Vet. Rec.* 125:591-593.
- Ehinger, A. M., H. Schmidt, and M. Kietzmann. 2006. Tissue distribution of cefquinome after intramammary and “systemic” administration in the isolated perfused bovine udder. *Vet. J.* 172:147-153.

European Medicines Agency. 1995. Committee for Veterinary Medical Products.

Cefquinome. Summary Report. EMEA/MRL/005/95. London, UK: European Agency for the evaluation of Medicinal Products.

European Medicines Agency. 2014. Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. EMA/381884/2014. London, UK.

Erskine, R. J., and R. J. Eberhart. 1990. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196:1230-1235.

Erskine, R. J. 1992. Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. Comp. Cont. Edu. Pract. 14:969-979.

Farnsworth, R., S. Stewart, and D. Reid. 2003. Dealing with *Streptococcus agalactiae* Mastitis. Accessed Oct. 05, 2016.
<https://www.qualitycounts.umn.edu/sites/qualitycounts.umn.edu/files/f-mc-2.pdf>.

Friedman, L. M., C. Furberg, and D. L. DeMets. 2010. Fundamentals of clinical trials. 3rd ed. Springer International Publishing, New York, USA.

Guterbock, W. M., and P. E. Blackmer. 1984. Veterinary interpretation of bulk tank milk. Vet. Clin. North. Am. Large Anim. Pract. 6:257-268.

Katholm, J., T. W. Bennedsgaard, M. T. Koskinen, and E. Rattenborg. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 95:5702-5708.

Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. Can. Vet. J. 38:429-437.

- Keefe, G. P. 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Vet. Clin. N. Am-Food A. 28:203-2016.
- Kingwill, R. G., F. K. Neave, F. H. Dodd, T. K. Griffin, D. R. Westgarth, and C. D. Wilson. 1970. The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years. Vet. Rec. 87:94-100.
- Leelahapongsathon, K., Y. H. Schukken, and W. Suriyasathaporn. 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. Trop. Anim. Health Prod. 46:1067-1078.
- Ma, Y., C. Ryan, D. M. Barbano, D. M. Galton, M. A. Rudan, and K. J. Boor. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci. 83:264-274.
- McDougall, S., D. G. Arthur, M. A. Bryan, J. J. Vermunt and A. M. Weir. 2007. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. New Zeal. Vet. J. 55:161-170.
- Moher D., S. Hopewell, K. F. Schulz, V. Montori, P. C. Gotzsche, P. J. Devereaux, D. Elbourne, M. Egger, and D. G. Altman. 2010. CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. Brit. Med. J. 340:c869.
- Natzke, R. P., R. W. Everett, R. S. Guthrie, J. F. Keown, A. M. Meek, W. G. Merrill, S. J. Roberts, and G. H. Schmidt. 1972. Mastitis control program: effect on milk production. J. Dairy Sci. 55:1256-1260.
- National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Verona, WI, EUA.
- Neave, F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwill, and D. R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J. Dairy Sci. 52:696-707.

Piaggio, G., D. R. Elbourne, D. G. Altman, S. J. Pocock, and S. J. W. Evans. 2006.

Reporting of non-inferiority and equivalence randomized trials: An extension of the CONSORT statement. *J. Am. Med. Assoc.* 295:1152-1160.

Pyorala S., L. Kaartinen, H. Kack, and V. Rainio. 1994. Efficacy of two therapy

regimes for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in the bovine. *J. Dairy Sci.* 77:453-461.

Ramírez, N. F., G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, and L. G. Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 97: 4141-4150.

Reyes, J., M. Chaffer, J. Sanchez, G. Torres, D. Macias, M. Jaramillo, and G. P. Keefe. 2015. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. *J. Dairy Sci.* 98:5294-5303.

Rossi, R., and J. C. F. Pantoja. 2015. Eficácia da cefquinoma intramamária no tratamento de mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae*. Pages 9-10 in Proc. Anais do VI Congresso de Qualidade do Leite, Curitiba, Paraná, 9-10.

SAS Institute. 2014. SAS User's Guide. Version 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Souza, G. N., J. R. Brito, E. C. Moreira, M. A. V. Brito, M. V. G. Silva. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 61:1015-1020.

Schukken, Y. H., and H. A. Deluyker. 1995. Design of field trials for the evaluation of antibacterial products for therapy of bovine clinical mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18:274-283.

- Schukken, Y.H., G. J. Bennett, M. J. Zurakowski, H. L. Sharkey, B. J. Rauch, M. J. Thomas, B. Ceglowski, R. L. Saltman, N. Belomestnykh and R. N. Zadoks. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94:6203-6215.
- Schukken, Y. H., M. J. Zurakowski, B. J. Rauch, B. Gross, L. L. Tikofsky, and F. L. Welcome. 2013. Non-inferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of non-severe clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6763-6774.
- Vasquez, A. K., D. V. Nydam, M. B. Capel, B. Ceglowski, B. J. Rauch, M. J. Thomas, L. Tikofsky, R. D. Watters, S. Zuidhof, and M. J. Zurakowski. 2016. Randomized non-inferiority trial comparing 2 commercial intramammary antibiotics for the treatment of non-severe clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:8267-8281.
- Weaver, L. D., J. Galland, P. A. Martin, and J. Versteeg. 1986. Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:666-669.
- World Health Organization. 2012. Critically important antimicrobials for human medicine, third revision. Accessed Oct. 6, 2016.
<http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en/>.
- Wilson, C. D., D. R. Westgarth, R. G. Kingwill, T. K. Griffin, F. K. Neave, and F. H. Dodd. 1972. Effect of infusion of sodium cloxacillin in all infected quarters of lactating cows in sixteen herds. *Brit. Vet. J.* 128:71-85.

- Wilson, D. J., R. N. Gonzalez, and H. das Helena. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592-2598.
- Wilson, D. J., R. N. Gonzalez, K. L. Case, L. L. Garrison, and Y. T. Groohn. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 82:1664-1670.
- Whitley, E. and J. Ball. 2002. Statistics review 4: Sample size calculations. *Crit. Care.* 6:335-341.
- Yamagata, M., W. J. Goodger, L. Weaver, and C. Franti. 1987. The economic benefits of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1556-1561.
- Yang Y., Y. Liu, Y. Ding, L. Yi, Z. Ma, H. Fan and C. Lu. 2013. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in eastern China. *Plos one.* 8: e67755.

Table 1. Characteristics of the herds enrolled into the study

Variable	Herd									Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Bulk tank SCC (x 1,000 cells/mL) ¹	960	1,900	1,317	1,165	760	1,800	1,600	882	1,380	
Number of lactating cows	77	38	22	33	23	40	71	82	71	457
Average milk yield (kg) ²	20.3	12.8	9.0	20.7	-	17.3	22.7	21.6	17.5	
Parity ³										
1	23 (30)	4 (10)	0 (0)	21 (64)	0 (0)	19 (49)	26 (38)	22 (27)	33 (51)	148 (33)
>1	54 (70)	34 (90)	22 (100)	12 (36)	23 (100)	20 (51)	43 (62)	59 (73)	32 (49)	299 (67)
Prevalence of <i>Streptococcus agalactiae</i> (cow level) ⁴	25 (32)	7 (18)	8 (36)	7 (21)	4 (17)	8 (20)	28 (39)	37 (45)	11 (15)	135 (30)
Prevalence of <i>Streptococcus agalactiae</i> (quarter level)	62 (20)	16 (11)	17 (20)	13 (10)	8 (9)	11 (7)	65 (23)	80 (25)	13 (5)	285 (16)

¹ Last bulk milk somatic cell count before beginning of treatments.

² Average milk yield (Kg/cow/d) on the day treatments began.

³ Parity data of 1, 2, 1, and 6 cows are missing for herds F, G, H and I, respectively.

⁴ A cow was considered positive if at least 1 quarter was infected with *S. agalactiae*, as diagnosed by microbiological examination of quarter milk samples.

Table 2. Cow characteristics after randomization

Cow characteristics ²	Study groups ¹							
	CLOXIMM		CEFIMM		CEFIM		CONTROL	
	Med ³	(Q1-Q3) ⁴	Med ³	(Q1-Q3) ⁴	Med ³	(Q1-Q3) ⁴	Med ³	(Q1-Q3) ⁴
Parity	3	(2-4)	2	(1-3)	3	(2-5)	3	(2-5)
Days in milk at treatment	197	(128-242)	180	(120-265)	200	(94-235)	145	(44-201)
Milk yield at treatment (Kg/cow/d)	18	(13-27)	22	(16-26)	18	(13-18)	14	(7-24)
Number of <i>Streptococcus agalactiae</i> infected quarters per cow	2	(1-3)	2	(1-3)	3	(2-4)	2	(1-2)

¹ CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicillin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. CEFIM: IM injection of cefquinome (1 mg/kg), every 24 h, for 3 d. CONTROL: did not receive any treatment or placebo.

² Statistics are presented at the cow level.

³ Median.

⁴ Interquartile range (first quartile – third quartile).

Table 3. *Streptococcus agalactiae* treatment efficacy and unadjusted bacteriological cure rates

Variable	Study group ¹							
	CLOXIMM		CEFIMM		CEFIM		CONTROL	
	N ²	N ³ (%)	N ²	N ³ (%)	N ²	N ³ (%)	N ²	N ³ (%)
D14								
Efficacy ⁴	93	80 (81)	95	93 (97)	31	17 (40)		
Bacteriological cure ⁵	93	80 (86)	95	93 (98)	31	17 (55)	16	4 (25)
D21								
Efficacy ⁴	90	74 (82)	95	88 (93)	31	16 (52)		
Bacteriological cure ⁵	90	74 (82)	95	88 (93)	31	16 (52)	16	0 (0)
D14 and D21								
Efficacy ⁴	94	77 (82)	100	93 (93)	31	16 (52)		
Bacteriological cure ⁵	94	77 (82)	100	93 (93)	31	16 (52)	16	0 (0)

¹ CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicilin (125 mg), every 24

h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3

consecutive milkings. CEFIM: IM injection of cefquinome (1 mg/kg), every 24 h, for 3

d. CONTROL: did not receive any treatment or placebo.

² Number of treated quarters.

³ Number (percentage) of cured quarters.

⁴ Efficacy at 14, 21 or 14 and 21 d after beginning of treatment. Efficacy was defined as the bacteriological cure rate difference between each treated group and CONTROL, divided by the cure rate of CONTROL.

⁵ Bacteriological cure at 14, 21 or 14 and 21 d after beginning of treatment.

Table 4. Adjusted *Streptococcus agalactiae* bacteriological cure rates

Variable	Coefficient	SE	P-Value	OR ¹	95% CI ²	Adjusted cure rate ³ (%)	95% CI ⁴
CURE14⁵							
Intercept	-1.16	0.61					
Study group⁶			< 0.01				
CLOXIMM	2.96	0.68		19.67	5.04 - 73.68	85.77	75.46 - 92.20
CEFIMM	5.03	0.96		153.30	23.32 - 999.99	97.96	91.58 - 99.53
CEFIM	1.19	0.69		3.29	0.86 - 12.78	50.80	30.67 - 70.58
CONTROL	Reference			Reference		23.84	8.63 - 50.92
CURE21⁵							
Intercept	0.28	0.74					
Study group⁶			< 0.01				
CLOXIMM	1.68	0.62		5.38	1.56 - 18.59	80.99	63.25 - 91.34
CEFIMM	2.67	0.70		14.50	3.66 - 57.48	91.99	79.63 - 97.12
CEFIM	Reference			Reference		44.20	19.14 - 72.61
CONTROL ⁷	-	-		-	-	-	-
Number of <i>Streptococcus agalactiae</i> infected quarters per cow			0.01				
1	-0.58	0.71		0.56	0.14 - 2.27	75.87	50.87 - 90.52
2	0.18	0.75		1.20	0.27 - 5.26	87.11	66.71 - 95.79
3	-1.63	0.63		0.20	0.06 - 0.67	52.30	29.05 - 74.59
4	Reference			Reference		84.93	61.95 - 95.13
CURE1421⁵							
Intercept	0.44	0.70					
Study group⁶			< 0.01				
CLOXIMM	1.69	0.61		5.47	1.65 - 18.14	81.86	66.59 - 91.08
CEFIMM	2.69	0.67		14.67	3.89 - 55.31	92.37	81.69 - 97.04
CEFIM	Reference			Reference		45.20	21.11 - 71.78
CONTROL ⁷	-	-		-	-	-	-
Number of <i>Streptococcus agalactiae</i> infected quarters per cow			0.01				
1	-0.67	0.70		0.52	0.13 - 2.09	77.81	55.14 - 90.91
2	-0.16	0.71		0.85	0.21 - 3.43	85.06	65.74 - 94.41
3	-1.72	0.62		0.18	0.05 - 0.61	54.53	32.68 - 74.77
4	Reference			Reference		87.00	67.49 - 95.57

¹ Odds ratio derived from a generalized linear model (logistic regression).

² Odds ratio 95% confidence interval.

³ Least square means derived from a generalized linear model (logistic regression).

⁴ Least square means 95% confidence interval.

⁵ Bacteriological cure rate at 14, 21 or 14 and 21 d after beginning of treatment.

⁶ CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicilin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. CEFIM: IM injection of cefquinome (1 mg/kg), every 24 h, for 3 d. CONTROL: did not receive any treatment or placebo.

⁷ Adjusted least square means for CURE21 and CURE1421 was not estimated because the statistical model did not converge (absence of uninfected quarters in CONTROL).

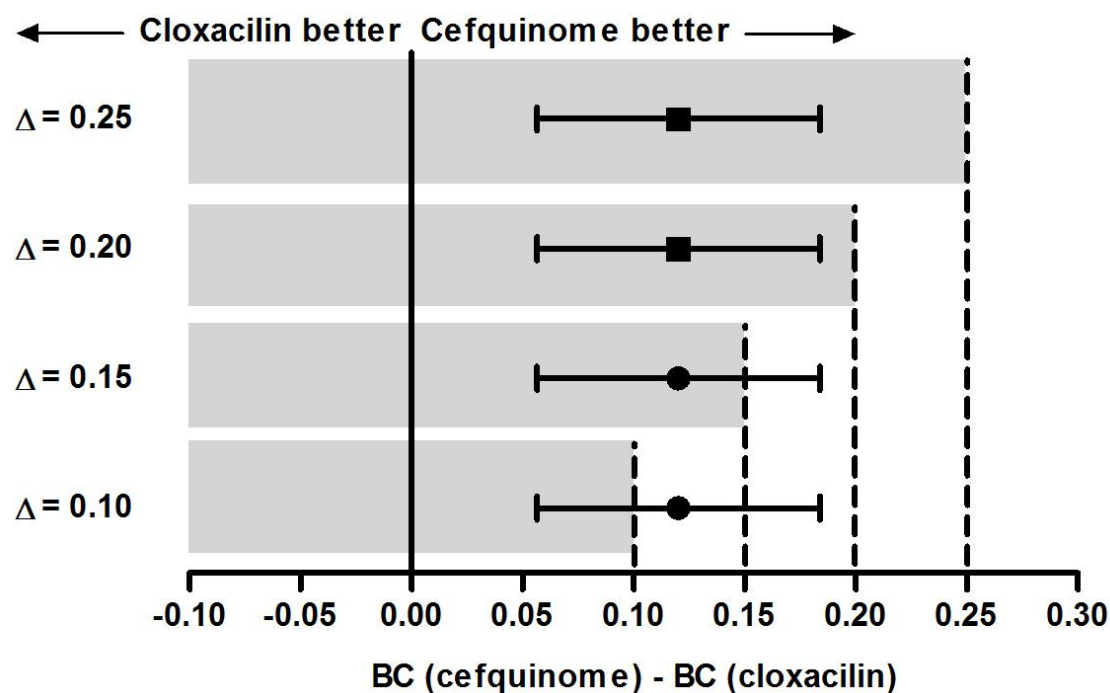


Figure 1. Graphical presentation for possible interpretations of the non-inferiority test considering different non-inferiority margins. The error bars indicate 95% confidence intervals (95% CI) for the difference between the bacteriological cure rates of the study groups. CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicillin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. The solid vertical line depicts the null difference between the treatments and the dotted vertical line depicts the maximum acceptable difference (0.10, 0.15, 0.20, and 0.25) between the treatments to conclude non-inferiority. The gray area depicts the non-inferiority zone for each non-inferiority margin. The horizontal lines with a central square depict the possible 95% CI in which non-inferiority can be determined. The horizontal line with a central circle depicts the possible 95% CI in which non-inferiority is inconclusive (Adapted from Piaggio et al., 2006).

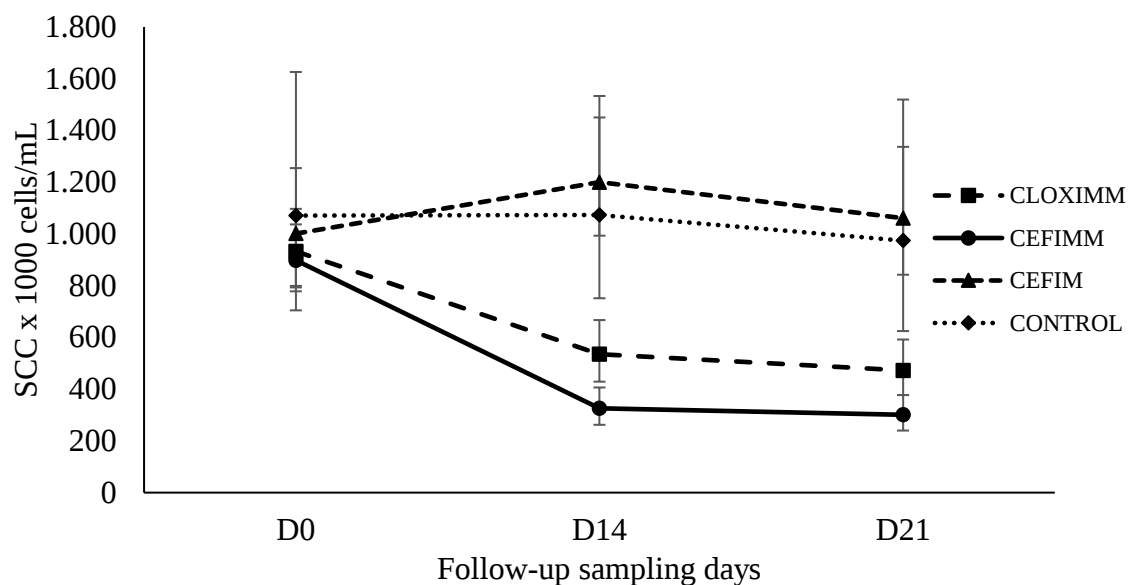


Figure 2. Geometric mean somatic cell count (SCC) of milk samples collected at initial screening (D0), and 14 (D14) and 21 (D21) d after the beginning of the treatments. The error bars indicate the 95% CI of the mean. CLOXIMM: IMM infusion of cloxacillin (250 mg) and ampicillin (125 mg), every 24 h, for 3 d. CEFIMM: IMM infusion of cefquinome (75 mg) every 12 h, for 3 consecutive milkings. CEFIM: IM injection of cefquinome (1 mg/kg), every 24 h, for 3 d. CONTROL: did not receive any treatment or placebo.

CAPÍTULO 3

Artigo a ser enviado para revista *Journal of Dairy Science*

(Normas de publicação – ANEXO I)

Diagnostic accuracy of the Somaticell, the California Mastitis Test, and microbiologic examination of composite milk to identify *Streptococcus agalactiae* intramammary infections

Rodolfo S. Rossi,* Ariadne F. Amarante,* Letícia B. N. Correia,* Simony T. Guerra,* Vera L. M. Rall,† José C. F. Pantoja*¹

*Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, 18618-981.

†Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP – Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, 18618-681.

¹ Corresponding author: pantoja@fmvz.unesp.br

ABSTRACT

The objectives of this study were to estimate the accuracy of the Somaticell, the California Mastitis Test (CMT), and the composite milk microbiological examination to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections (IMI), and to assess the agreement between the Somaticell and the CMT in diagnosing these infections. Seven farms were included in the study. The CMT test was performed on all quarters of all lactating cows. Aseptic milk samples were collected from all quarters tested with the CMT. Composite milk samples were produced in the laboratory by mixing milk from all quarters of a cow. The Somaticell was used to perform somatic cell counting (SCC) on all negative (no growth) and *S. agalactiae*-positive quarter milk samples. Microbiological examination of quarter milk samples was considered the reference test for diagnosing *S. agalactiae*. The accuracy of all tests at various thresholds was calculated. The prevalence of *S. agalactiae* (based on microbiological examination of milk) at the cow (N = 304) and quarter (N = 1,216) level was 28.6 and 15.8%, respectively. The sensitivity and specificity of composite milk samples (as compared with quarter milk samples) were 89.7 and 98.2%, respectively (accuracy = 95.7%). A total of 326 quarter milk samples were used to estimate the accuracy of the Somaticell and the CMT to identify *S. agalactiae* infected quarters, of which 53.4% (N = 174) were positive and 46.6% (N = 152) were negative for *S. agalactiae*. The accuracy of the Somaticell to identify *S. agalactiae* infected quarters was 75.2, 86.2, 89.0, 89.9, 91.4% at the thresholds of 98,000, 147,000, 205,000, 244,000, and 282,000 cells/mL, respectively. The accuracy of the CMT was 87.4, 90.5, 91.1, and 86.8% at the thresholds of traces, 1, 2, and 3, respectively. At the most accurate thresholds, the agreement between the Somaticell and the CMT was 80.9%. Once a cow was diagnosed with *S. agalactiae* IMI, the Somaticell's threshold of 205,000 cells/mL resulted in

sensitivity of 97.1% and 2.9% of false-negative results, which could be preferable to the CMT's threshold of trace, which resulted in sensitivity of 91.9% and 8.1% of false-negative results. Findings of the present study can be used to reduce the use of antimicrobials in *S. agalactiae* eradication programs, by using SCC-based diagnostic tests to identify infected quarters from cows previously diagnosed with *S. agalactiae* by means of microbiological examination of composite milk.

Key words: milk quality, subclinical mastitis, somatic cell count, on-farm test, sensibility.

INTRODUCTION

Streptococcus agalactiae is still one of the most prevalent contagious pathogens in many dairy regions worldwide. Prevalences of 60% at the herd level, and between 7 and 35% at the cow level have been reported in countries such as Brazil (Brito et al., 1999), China (Yang et al., 2013), Thailand (Leelahapongsathon et al., 2014), and Colombia (Ramírez et al., 2014; Reyes et al., 2015). In Denmark, a possible re-emergency of this pathogen at herd level was reported by Katholm et al. (2012).

Intramammary infections (**IMI**) caused by *S. agalactiae* are associated with high somatic cell count (**SCC**) (average of 2,238,000 cells/mL; Erskine, 1992), decrease in milk production (1.6 to 4.5 Kg/day; Natzke et al., 1972; Wilson et al. 1997) and recurrent episodes of clinical mastitis (Leelahapongsathon et al., 2014). Herds infected with *S. agalactiae* usually present high SCC (Keefe et al., 1997) and total bacteria count in bulk tank milk (Hogan et al., 1986), once cows infected can shed up to 10^7 bacteria/mL of milk (Guterbock and Blackmer, 1984).

S. agalactiae has been eradicated from many developed dairy regions, by means of control programs consisting of systematic identification and treatment of infected animals (“blitz-therapy”) (Keefe, 1997). As part of such programs, microbiological examination of composite milk samples (mixture of milk from all quarters of a cow) has been used as a screening strategy to identify infected animals (Weaver, 1986; Yamagata et al., 1987; Farnsworth, 2003). The sensitivity and specificity of composite milk culture were estimated in 96.5 and 100%, respectively, when compared with single quarter milk culture (Dinsmore et al., 1991). Furthermore, no differences were noted in *S. agalactiae* recovery when a larger volume of inoculum and enhanced culture techniques, such as pre-incubation, were used (Dinsmore et al., 1992).

Different treatment strategies have been used to eradicate *S. agalactiae* from dairy herds. Traditionally, treatment of all quarters of all cows in herds where *S. agalactiae* had been isolated from bulk tank milk (Edmondson, 2010), or treatment of all quarters of all cows from which *S. agalactiae* had been isolated from composite milk samples, have been used, regardless of the number of infected quarters (Edmondson, 1989; Erskine and Eberhart, 1990; Farnsworth et al., 2003). These strategies result in great antimicrobial waste and increased costs due unnecessary treatment of uninfected quarters. Moreover, pressure to reduce antimicrobial use in livestock animals is increasing in the last decades (European Medicines Agency, 2014).

Nowadays, the strategy of treating all quarters of cows previously diagnosed with *S. agalactiae* from composite milk samples faces resistance by farmers due to the unnecessary cost of treating uninfected quarters. Thus, identification of truly infected quarters before treatment by means of a screening test could substantially reduce treatment costs, prevent unnecessary exposure of healthy quarters to antimicrobials, and decrease the risk of bulk milk contamination with antimicrobial residues.

An alternative to identify *S. agalactiae* infected quarters of culture-positive cows is the California Mastitis Test (**CMT**). Nonetheless, the CMT's sensitivity to detect infected quarters can result in up to 20% of false-negative results (Dingwell et al., 2003). Failure to detect truly infected quarters is an issue in eradication programs because maintenance of reservoirs can lead to infection of uninfected quarters, and reinfection of treated and cured quarters. The Somaticell is a cow-side test that could be an alternative to the CMT. The test has been previously validated, showing strong agreement with flow-cytometry SCC (Rodrigues et al., 2009).

The objectives of this study were to estimate the accuracy of the Somaticell, the CMT, and the composite milk microbiological examination to detect *S. agalactiae*

intramammary infections, and to assess the agreement between the Somaticell and the CMT in diagnosing these infections.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by UNESP's Ethics Committee for Animal Use, protocol 07/2015.

Selection of herds and cows

Herds were eligible for enrollment into the study if had bulk tank milk SCC > 700,000 cells/mL (Erskine and Eberhart, 1990) on the last available official test day, had *S. agalactiae* isolated from the bulk tank milk, were composed of at least 20 lactating cows (mostly Holsteins or Holstein-crossbreds), milked cows using milking machines, and offered voluntary cooperation with the study. Cows were eligible for enrollment if they were not showing any sign of disease and did not receive any antimicrobial, for any reason, within 15 d of the beginning of the study.

Sampling strategy

A convenience sample of farms that attended the inclusion criteria (N = 7) were visited to explain the study protocol and obtain informed consent. After examining the first streams of milk for detection of clinical mastitis, use of pre-dipping, and drying of teats, the CMT test was performed on all quarters of all lactating cows. The CMT results were recorded as 0 (negative), traces (slight reaction), 1 (mild reaction), 2 (moderate reaction), and 3 (strong reaction). Subsequently, teat ends were scrubbed with a gauze pad soaked with 70° alcohol and aseptic milk samples (15 mL) were collected from all quarters tested with the CMT.

Upon collection, samples were identified and maintained refrigerated until arrival to UNESP's Mastitis Research and Diagnosis Laboratory. Microbiological examination was performed on the same day, within 24 h of collection.

Microbiological examination of milk

Milk samples were examined according to the NMC's procedures (NMC, 1999). Ten μL of milk were streaked onto a quadrant of a blood agar plate and incubated at 36 °C. Samples were read at 24, 48 and 72 h. An IMI was defined as the presence of pure growth of ≥ 3 similar colonies on the plate. Samples were considered negative when there were ≤ 2 similar colonies on the plate, and contaminated when there were ≥ 3 types of colonies on the plate. Diagnosis of *S. agalactiae* was performed based on phenotypic identification of colonies, Gram staining and further biochemical tests. Positive samples were Gram-positive cocci, catalase-negative, aesculin and bile aesculin-negative, and positive for the Christie, Atkins e Munch-Petersen (**CAMP**) test.

Composite milk samples were produced in the laboratory by mixing 2 mL of milk from each quarter sample of a cow in a 15-mL sterile vial. Subsequently, 10 μL of the composite milk were inoculated onto a quadrant of a blood agar plate and incubated for 72 h at 36 °C, as previously described.

Diagnosis of *S. agalactiae* from composite milk samples was initially performed based on phenotypic characteristics and hemolysis in blood agar. Catalase-negative, Gram-positive cocci, sampled from translucent or grayish colonies were considered as streptococci (Markey et al., 2013) and evaluated for hemolysis pattern. When there was growth of streptococci exhibiting different types of hemolysis (α , β , or γ) within the same quadrant, 1 colony of each hemolysis type was submitted to biochemical tests (aesculin, bile aesculin, and the CAMP test). When only one pattern of hemolysis was

observed, the quadrant was divided into 3 equal areas and 1 colony from each area was used to perform the tests aforementioned.

Microbiological examination of composite and quarter milk samples was performed blindly, so that the investigators could not know the results of quarter milk samples before reading the results of composite milk samples.

The Somaticell (Madasa, Sao Paulo, Brasil) was used to estimate SCC on all negative milk samples (no growth) and on all *S. agalactiae*-positive quarter milk samples, following the manufacturer's instructions. Two mL of reagent and milk were mixed in a plastic tube and homogenized for 30 s. The tube was then held upside down for 30s for draining of the solution and the reading (cells/mL) was performed using the scale marked on the tube.

Sample size calculation

The sample size was calculated to estimate proportions (sensitivity and specificity) with a given precision. Assuming $\alpha = 0.05$, expected sensitivity and specificity = 0.9 (McDermott et al., 1982), and a margin of error of ± 0.05 , 100 *S. agalactiae* infected quarters and 100 uninfected quarters were required to achieve the proposed objectives (Machin et al., 1997).

Statistical analysis

Definitions for analysis. Microbiological results of quarter milk samples were considered the reference test for diagnosing *S. agalactiae*. A cow was considered positive if *S. agalactiae* was isolated from at least 1 quarter. Sensitivity was defined as the proportion of truly infected (based on the reference test) cows and quarters correctly

identified as positive by microbiological examination of composite milk, Somaticell or CMT. Specificity was defined as the proportion of truly uninfected cows and quarters correctly identified as negative by microbiological examination of composite milk, Somaticell or CMT. The proportions of false-negative and false-positive test results were defined as 1-sensitivity and 1-specificity, respectively (Dohoo et al., 2003).

The positive predictive value (PPV) was defined as the proportion of positive tests (microbiological examination of composite milk, Somaticell or CMT) that corresponded to truly infected quarters or cows. The negative predictive value (NPV) was defined as the proportion of negative tests (microbiological examination of composite milk, Somaticell or CMT) that corresponded to truly uninfected quarters or cows. Test accuracy was defined as the proportion of positive and negative correct test results, as compared with the reference test (Dohoo et al., 2003).

Analytical procedures. The accuracy of microbiological examination of composite milk was estimated to identify cows infected with *S. agalactiae*. The accuracy of the Somaticell and the CMT was estimated to identify quarters infected with *S. agalactiae*.

Based on the Somaticell reading scale, 5 thresholds were selected: 98,000, 147,000, 205,000, 244,000, and 282,000 cells/mL. These thresholds were chosen because they were the closest on the test scale to the 200,000 cells/mL threshold, with 50,000 cells/mL intervals, from 100,000 to 300,000 cells/mL. For the CMT test, thresholds of traces, 1, 2, and 3 were used for analysis.

Sensitivity, specificity, proportion of false-negative and positive results, PPV and, NPV for all tests and thresholds were estimated with respective 95% confidence intervals (95% CI). The Kappa coefficient was used to estimate the agreement between the diagnostic tests.

In addition to the Somaticell and CMT accuracy assessment using the proposed thresholds, Receiver Operating Characteristics (**ROC**) curves were constructed for both tests. Comparison between the ROC curves was performed by calculating the area under the curve (AUC) and their respective 95% CI (PROC LOGISTIC, SAS Institute, 2009). The most accurate Somaticell threshold was determined by the Youden's method (Youden, 1950).

RESULTS

Herd characteristics

The study was conducted in 7 commercial farms in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil, between February and October 2016. Cows were milked in pit parlors (N = 4 farms) or stanchion barns (N = 3 farms). Herd size ranged from 22 to 77 lactating Holsteins or Holstein-crossbred cows. Cows were milked twice a day and were housed in semi-confinement systems. Of these cows, 93, 70, 76, and 62 were in first, second, third, and > fourth lactation, respectively (3 missing data). The median milk yield was 18 Kg/cow/day (interquartile range = 13-25 Kg/cow/day).

Milk samples from a total of 1,216 quarters from 304 cows were submitted to the CMT and microbiological examination of milk. The overall prevalence of *S. agalactiae* IMI (based on microbiological examination of milk) was 15.8% (N = 192/1,216 quarters) at the quarter level and 28.6% (N = 87/304 cows) at the cow level.

Diagnostic accuracy of composite milk samples

Of the 87 cows that were culture-positive for *S. agalactiae* based on quarter milk samples, 89.7% (N = 78) were also positive and 10.3% (N = 9) were negative based on composite milk samples. Of the 217 cows that were negative for *S. agalactiae* based on

quarter milk samples, 98.2% (N = 213) were also negative and 1.8% (N = 4) were positive based on composite milk samples. The Kappa coefficient resulted in an agreement of 89.3% between the tests. The sensitivity, specificity, percentage of false-negative and positive results, PPV and NPV of composite milk samples were 89.7, 98.2, 10.3, 1.8, 95.1 and 95.9%, respectively. The diagnostic accuracy of composite milk samples was 95.7% (Table 2).

Diagnostic accuracy of the Somaticell and the California Mastitis Test

A total of 326 quarter milk samples were used to estimate the accuracy of the Somaticell and the CMT to diagnose *S. agalactiae*. Of these samples, 53.4% (N = 174) were culture-positive and 46.6% (N = 152) were culture-negative for *S. agalactiae*. The median SCC (Q1-Q3), as performed with the Somaticell test, was 1,380,000 (630,000 - 1,970,000) and 98,000 (80,000-166,000 cells/mL) for the positive and negative milk samples, respectively. Of all CMT tests performed, the distribution of the scores negative, traces, 1, 2, and 3 was 8, 1, 1, 9, and 81% for the positive samples and 82, 8, 3, 1, and 6% for the negative samples, respectively.

The Somaticell and CMT's sensitivity, specificity, percentage of false-negative and positive results, PPV, and NPV at each proposed threshold are presented in Table 2 and Figure 1. The Somaticell threshold of 282,000 cells/mL and the CMT score of 2 resulted in the greatest test accuracy.

Agreement between the Somaticell and the California Mastitis Test

Considering the Somaticell threshold of 282,000 cells/mL and the CMT score of 2, 162 (97.0%) and 26 (16.4%) of the 188 milk samples identified as positive by the Somaticell were also diagnosed as positive and negative with the CMT, respectively.

133 (83.7%) and 5 (3.0%) of the 138 samples diagnosed as negative with the Somaticell were negative and positive with the CMT, respectively. The agreement between the tests (Kappa coefficient) was 80.9% (95% CI: 74.6, 87.3%).

The area under the ROC curve for the Somaticell and the CMT was 94.5% (95% CI: 91.8, 97.2) and 92.0% (95% CI: 88.6, 95.4), respectively ($P = 0.09$, Figure 2).

According to the Youden's test, the estimated Somaticell's most accurate threshold for identification of *S. agalactiae* IMM was 288,543 cells/mL, for which sensitivity and specificity were 94.8% (95% CI: 90.4, 97.6) and 87.5% (95% CI: 81.2, 92.3), respectively.

DISCUSSION

In traditional eradication programs, all quarters of a cow previously diagnosed with *S. agalactiae* by means of microbiological examination of composite milk have been usually treated with IMM antimicrobials (Edmondson, 1989; Erskine and Eberhart, 1990; Farnsworth et al., 2003), regardless of the number of infected quarters. Nevertheless, this treatment strategy has become less acceptable, due to the increasing pressure to reduce antimicrobial use in livestock animals and the cost of unnecessarily treating uninfected quarters. In the Netherlands, preventive use of antimicrobials for veterinary use in livestock production has been prohibited since 2013. Traditional treatment strategies, such as blanket dry cow therapy, have been replaced by other alternatives, such as selective dry cow therapy (Scherpenzeel et al., 2016).

In this context, results of the present study can be used to reduce the use of antimicrobials in *S. agalactiae* eradication programs, by using SCC-based diagnostic tests to identify infected quarters from cows previously diagnosed with *S. agalactiae* by means of microbiological examination of composite milk. Analysis of the Somaticell's

ROC curve indicated that the most accurate threshold to diagnose *S. agalactiae* IMI was 282,000 cells/mL, at which sensitivity and specificity were 96.0 and 86.2%, respectively.

Nonetheless, the most accurate threshold (at which both sensitivity and specificity are maximized) may not always be the most useful for *S. agalactiae* eradication programs. A substantial effort must be made to maximize the identification of *S. agalactiae* truly infected quarters (sensitivity) because false-negative quarters are left untreated and can rapidly transmit this pathogen to healthy quarters, compromising the eradication program and frustrating the milk producer. Leelahapongsathon et al. (2016) reported that the incidence rate of *S. agalactiae* was 0.09 new cases/quarter-month at risk, suggesting that, in the presence of infected cows, 9% of healthy quarters would develop new *S. agalactiae* IMI within a 30-d interval. In contrast, false-positive results would lead to unnecessary treatment of uninfected quarters, which would increase therapy costs and the risk of antimicrobial residues in the bulk tank milk.

Therefore, changes in the threshold can be made according to the objectives of the eradication program. For example, reducing the Somaticell's threshold to 205,000 cells/mL would result in only 2.9% of false-negative results, and 20.4% of false-positive results, that is, of 100 truly infected quarters, 3 would be misdiagnosed as uninfected and 20 would be unnecessarily treated with an antimicrobial. Reducing the threshold would maximize the identification of truly infected quarters and shorten the duration of the eradication program, at the cost of increasing the number of unnecessarily treated quarters. In contrast, increasing the threshold to 244,000 or 282,000 cells/mL would reduce the number of treated quarters, at the cost of increasing the number of false-negative results.

Although the most accurate CMT's threshold was 2 (accuracy = 91.1%, Table 2), considering any positive reaction ($\geq$ traces) as the CMT threshold would result in similar sensitivities, at the cost of increasing the percentage of false-positive results from 7.2% (score 2) to 9.9% (score 1) and 17.8% (traces). Reduction in the threshold could facilitate the reading of the test results since any viscosity change would be considered a positive result.

Although the Somaticell (94.5%) and the CMT (92.0%) areas under the ROC curve were not statistically different, the CMT's percentage of false-negative results, at a threshold of traces, was approximately 5 percentage points greater (8.1%) than the Somaticell's at a threshold of 205,000 cells/mL (2.9%), which could justify its use in *S. agalactiae* eradication programs.

Microbiological examination of composite milk samples has been traditionally used as a screening strategy in *S. agalactiae* eradication programs (Weaver et al., 1986; Yamagata et al., 1987; Farnsworth, 2003). This approach is feasible due to the great shedding of bacteria in milk of *S. agalactiae* infected cows (10^7 bacteria/mL; Guterbock and Blackmer, 1984). The sensitivity and specificity of microbiological examination of composite milk observed here were slightly lower than those reported by Dinsmore et al. (1991) (sensitivity = 96.5% and specificity = 100%), probably due to a smaller milk volume (10 μ L) plated on a smaller area (a quarter of a blood-agar plate).

Even so, the sensitivity of microbiological examination of composite milk was 89.7%, that is, 9 out of 10 truly infected cows would be correctly identified. High sensitivity and lower cost are important characteristics of diagnostic tests used for population screening (Dohoo et al., 2003). In *S. agalactiae* eradication programs, replacement of single quarter by composite milk microbiological examination as a screening method would be justifiable since herd-screening costs would be reduced to

approximately a quarter, with little loss in sensitivity. Reducing costs to identify positive cows could encourage producers to participate in such programs.

CONCLUSIONS

Microbiological examination of composite milk was an accurate test to identify cows with *S. agalactiae* IMI. Although the Somaticell's and CMT's most accurate threshold to diagnose *S. agalactiae* IMI were 282,000 cells/mL and score 2, respectively, changes in the threshold can be made according to the objectives of the eradication program. In "blitz-therapy" programs, it is desirable to maximize the sensitivity of the test and minimize the proportion of false-negative results. Once a cow was diagnosed with *S. agalactiae* IMI, the Somaticell's threshold of 205,000 cells/mL resulted in sensitivity of 97.1% and 2.9% of false-negative results, which could be preferable to the CMT's threshold of traces, which resulted in sensitivity of 91.9% and 8.1% of false-negative results.

Results of the present study can be used to reduce the use of antimicrobials in *S. agalactiae* eradication programs, by using SCC-based diagnostic tests to identify infected quarters from cows previously diagnosed with *S. agalactiae* by means of microbiological examination of composite milk. Further studies with an economic focus are important to determine which diagnostic strategy has the best cost-benefit for identifying animals and quarters infected with *S. agalactiae*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the farmers and their staff for cooperating with the study. This research was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant

2015/21157-0. The scholarship (132538-2015-6) of Rodolfo S. Rossi was provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ).

REFERENCES

- Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, M. T. Ribeiro, and V. M. O. Veiga. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: Exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 51:129-135.
- Dingwell R. T., K. E. Leslie, Y. H. Schukken, J. M. Sargeant, and L. L. Timms. 2003. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can. Vet. J.* 44:413-416.
- Dinsmore, R. P., P. B. English, R. N. Gonzalez, P. M. Sears, and H. F. Schulte. 1991. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:1521-1526.
- Dinsmore, R. P., P. B. English, R. N. Gonzalez, P. M. Sears. 1992. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 75:2706-2712.
- Dohoo, I., Martin, W. and Stryhn, H. 2003. Screening and diagnostic tests. Pages 85-120 in *Veterinary epidemiologic research*. 1st ed. AVC Incorporated, Charlottetown, PE.
- Edmondson, P. W. 1989. An economic justification of “blitz” therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. *Vet. Rec.* 125:591-593.
- Edmondson, P. 2010. Blitz therapy and *Streptococcus agalactiae*. *Vet. Rec.* 116:342.
- Erskine, R. J. 1992. Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. *Comp. Cont. Edu. Pract.* 14:969-979.

- Erschine, R. J., and R. J. Eberhart. 1990. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196:1230-1235.
- European Medicines Agency. 2014. Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. EMA/381884/2014. London, UK.
- Farnsworth, R., S. Stewart, and D. Reid. 2003. Dealing with *Streptococcus agalactiae* Mastitis. Accessed Oct. 05, 2016.
<https://www.qualitycounts.umn.edu/sites/qualitycounts.umn.edu/files/f-mc-2.pdf>.
- Guterbock, W. M., and P. E. Blackmer. 1984. Veterinary interpretation of bulk tank milk. Vet. Clin. North. Am. Large Anim. Pract. 6:257-268.
- Hogan, J. S., J. W. Pankey, P. Murdough, and D. B. Howard. 1986. Survey of bulk tank milk using blood-esculin agar counts. J Food Protect. 49:990-993.
- Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. Can. Vet. J. 38:429-437.
- Katholm, J., T. W. Bennedsgaard, M. T. Koskinen, and E. Rattenborg. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 95:5702-5708.
- Leelahapongsathon, K., Y. H. Schukken and W. Suriyasathaporn. 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. Trop. Anim. Health Prod. 46:1067-1078.
- Leelahapongsathon, K., Y. H. Schukken, T. Pinyopummintr, and W. Suriyasathaporn. 2016. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. J. Dairy Sci. 99:1418-1426.

- Machin D., M. Campbell, P. Fayers, and A. Pinol. 1997. Sample Size Tables for Clinical Studies. 2nd ed. Wiley-Blackwell Science, Oxford, UK.
- Markey, B., F. Leonard, M. Archambault, A. Cullinane, and D. Maguire. 2013. The streptococci and related cocci. Pages 121-134 in Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. Elsevier, Edinburgh, UK.
- McDermott, M. P., H. N. Erb, and R. P. Natzke. 1982. Predictability by somatic cell counts related to prevalence of intrammary infection within herds. J. Dairy Sci. 65:1535-1539.
- National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Verona, WI, EUA.
- Natzke, R. P., R. W. Everett, R. S. Guthrie, J. F. Keown, A. M. Meek, W. G. Merrill, S. J. Roberts, and G. H. Schmidt. 1972. Mastitis control program: effect on milk production. J. Dairy Sci. 55:1256-1260.
- Ramírez, N. F., G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, and L. G. Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. J. Dairy Sci. 97:4141-4150.
- Reyes, J., M. Chaffer, J. Sanchez, G. Torres, D. Macias, M. Jaramillo, and G. P. Keefe. 2015. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. J. Dairy Sci. 98:5294-5303.
- Rodrigues A. C. O., L. D. Cassoli, P. F. Machado, and P. L. Ruegg. 2009. Short communication: Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. J. Dairy Sci. 92:990-995.

- Scherpenzeel, C. G. M., I. E. M. den Uijl, G. van Schaik, R. O. Riekerink, H. Hogeveen, and T. J. G. M. Lam. 2016. Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage, and economics. *J. Dairy Sci.*, 99:3753-3764.
- SAS Institute. 2009. SAS User's Guide. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Weaver, L. D., J. Galland, P. A. Martin, and J. Versteeg. 1986. Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:666-669.
- Wilson, D. J., R. N. Gonzalez, and H. das Helena. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592-2598.
- Yamagata, M., W. J. Goodger, L. Weaver, and C. Franti. 1987. The economic benefits of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1556-1561.
- Yang Y., Y. Liu, Y. Ding, L. Yi, Z. Ma, H. Fan and C. Lu. 2013. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in eastern China. *Plos one.* 8: e67755.
- Youden, W. J. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.*3:32-35.

Table 1. Diagnostic accuracy of composite milk, Somaticell and CMT tests at different thresholds for cow and quarter diagnostic of *Streptococcus agalactiae* intramammary infection

Parameter ¹	Sensitivity		Specificity		False-negative		False-positive		PPV ²		NPV ³		Accuracy
	%	95% CI ⁴	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	
Composite Milk⁵	89.7	81.3 - 95.2	98.2	95.3 - 99.5	10.3	4.8 - 18.7	1.8	0.5 - 4.6	95.1	88.0 - 98.7	95.9	92.4 - 98.1	95.7
Somaticell⁶													
98.000	99.4	96.8 - 99.9	47.4	39.2 - 55.6	0.6	0.1 - 3.2	52.6	44.4 - 60.8	68.4	62.3 - 74.1	98.6	92.6 - 99.9	75.2
147.000	98.8	95.9 - 99.9	71.7	63.8 - 78.7	1.2	0.1 - 4.1	28.3	21.3 - 36.2	80.0	74.0 - 85.1	98.2	93.6 - 99.8	86.2
205.000	97.1	93.4 - 99.1	79.6	72.3 - 85.7	2.9	0.9 - 6.6	20.4	14.3 - 27.7	84.5	78.7 - 89.2	96.0	91.0 - 98.7	89.0
244.000	96.0	91.9 - 98.4	82.9	75.9 - 88.5	4.0	1.6 - 8.1	17.1	11.5 - 24.0	86.5	80.9 - 91.0	94.7	89.5 - 97.9	89.9
282.000	96.0	91.9 - 98.4	86.2	79.7 - 91.2	4.0	1.6 - 8.1	13.8	8.8 - 20.3	88.8	83.4 - 92.9	94.9	89.8 - 97.9	91.4
CMT⁶													
traces	91.9	86.9 - 95.5	82.2	75.2 - 88.0	8.1	4.5 - 13.1	17.8	12.0 - 24.8	85.6	79.7 - 90.3	89.9	83.7 - 94.4	87.4
1	90.8	85.5 - 94.6	90.1	84.2 - 94.4	9.2	5.3 - 14.5	9.9	5.6 - 15.7	91.3	86.1 - 95.1	89.5	83.6 - 93.9	90.5
2	89.7	84.1 - 93.7	92.8	87.4 - 96.3	10.3	6.25 - 15.9	7.2	3.7 - 12.6	93.4	88.5 - 96.7	88.7	82.7 - 93.1	91.1
3	80.5	73.8 - 86.1	94.1	89.1 - 97.3	19.5	13.9 - 26.2	5.9	2.7 - 10.9	94.0	88.8 - 97.2	80.8	74.2 - 86.3	86.8

¹ Reference test for accuracy calculation was the quarter milk microbiological exam.

² Positive predictive value.

³ Negative predictive value.

⁴ 95% confidence interval.

⁵ Composite milk samples (mixture of milk from all quarters of a cow); N = 304 cows.

⁶ Somaticell (Madasa, São Paulo, Brazil) and California Mastitis Test (CMT) thresholds; N = 326 quarters.

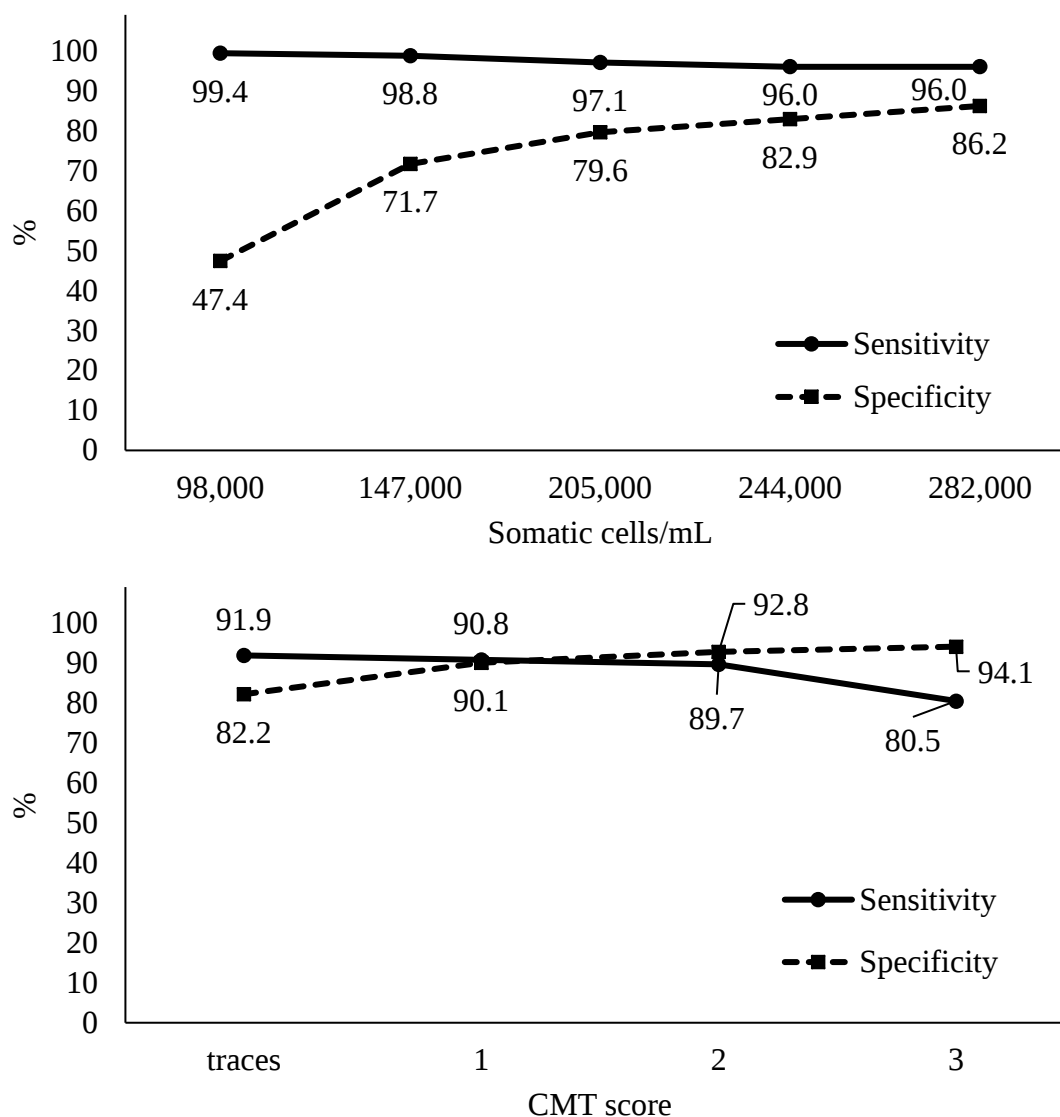


Figure 1. Sensitivity and specificity of Somaticell (upper graph) (Madasa, São Paulo, Brazil) and California Mastitis Test (CMT) (lower graph) at different thresholds for quarter *Streptococcus agalactiae* intramammary infection diagnostic in 326 quarter milk samples. For CMT test, scores traces, 1, 2 and 3 represent trace, weak, distinct and strong positive results, respectively.

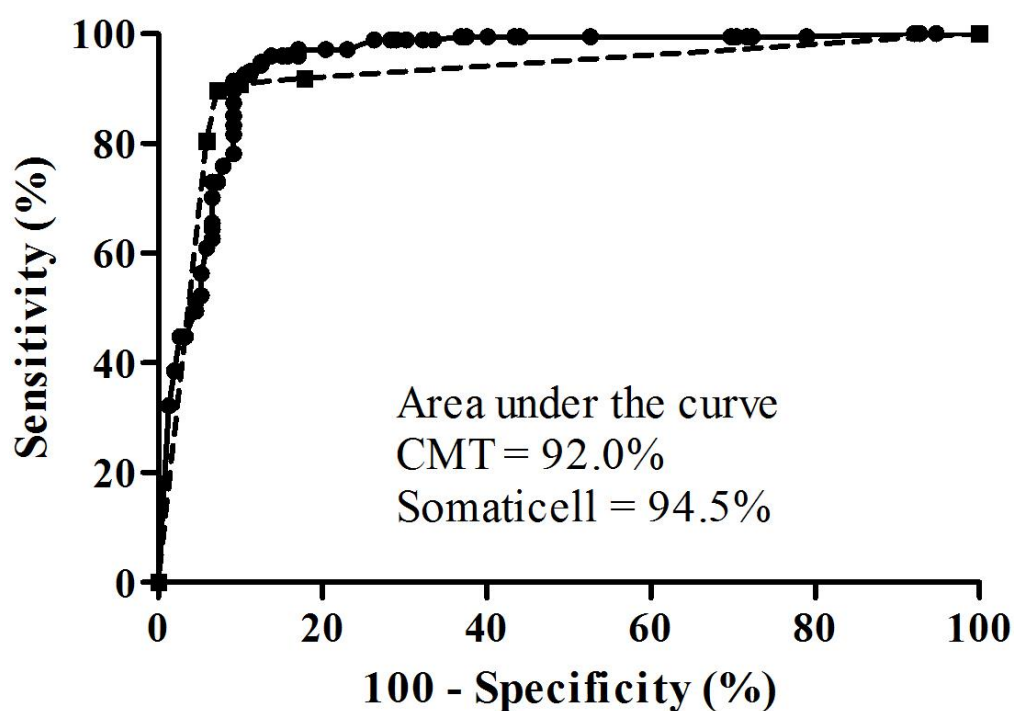


Figure 2. Receiver operating characteristics (ROC) non-parametric curves to diagnose *Streptococcus agalactiae* intramammary infection on the Somaticell (Madasa, São Paulo, Brazil) and California Mastitis Test (CMT) of 326 quarter milk samples. The solid and dotted lines depict the Somaticell and CMT ROC curves, respectively. Thresholds were chosen based on Somaticell scale marked tube (circles) and the CMT scale (squares) of 0 (negative), traces (slight reaction), 1 (mild reaction), 2 (moderate reaction), and 3 (strong reaction). Microbiological examination of milk was used as the reference test. The area under the ROC curve for the Somaticell and the CMT was 94.5% (95% confidence interval: 91.8-97.2) and 92.0% (95% confidence interval: 88.6-95.4), respectively ($P = 0.09$).

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

A erradicação de *S. agalactiae* em rebanhos leiteiros pode ser realizada de forma eficiente e economicamente viável. Em países como EUA, Canadá e Dinamarca, programas de controle e erradicação de patógenos contagiosos, baseados na identificação e tratamento sistemático dos animais infectados (“blitz-terapia”), resultaram em diminuição gradual na prevalência de *S. agalactiae* entre as décadas de 1970 e 1990 (KEEFE, 2012). Nestes programas, o antimicrobiano de eleição utilizado para o tratamento dos animais eram as penicilinas naturais e semi-sintéticas (KEEFE, 1997).

A estratégia terapêutica tradicional preconizava o tratamento de todos os animais do rebanho uma vez que *S. agalactiae* tivesse sido identificado no leite do tanque (FARNSWORTH; STEWART; REID, 2003), ou tratamento de todos os quartos de todas as vacas positivas para *S. agalactiae*, independentemente do número de quartos realmente infectados (WILSON et al., 1972; DAVIS et al., 1975; ERSKINE; EBERHART, 1990; WEAVER et al., 1986; WILSON et al., 1999; REYES et al., 2015). Como consequência, custos adicionais eram gerados com o tratamento desnecessário de quartos sadios e exposição desnecessária destes quartos aos antimicrobianos.

Nas últimas décadas têm crescido a pressão da sociedade para redução do uso indiscriminado de antimicrobianos em animais de produção. Na Holanda, o uso preventivo de antimicrobianos na produção animal foi proibido em 2013 (SCHERPENZEEL et al., 2016). Neste contexto, o desenvolvimento de novas estratégias de identificação e tratamento de animais infectados com *S. agalactiae* em programas de erradicação são importantes para reduzir os custos, maximizar as taxas de cura e aumentar a adesão a estes programas.

A escolha do antimicrobiano para o tratamento dos animais deve ser realizada seguindo-se as recomendações da OMS (Organização Mundial de Saúde; WHO, 2012), evitando-se o uso de antimicrobianos de importância crítica para uso humano caso houver fármacos tradicionais que apresentem a mesma eficácia terapêutica. Programas de erradicação com maior viabilidade financeira podem estimular a adesão dos produtores e contribuir para a melhoria da qualidade do leite nos rebanhos brasileiros.

A utilização da cefquinoma em programas de erradicação seria interessante caso apresentasse taxas de cura significativamente maiores do que a terapia convencional com penicilinas naturais e semi-sintéticas (como a cloxacilina), maximizando a cura dos

quartos infectados e reduzindo o número de retratamentos necessários para alcançar a erradicação de *S. agalactiae*. Outra possibilidade interessante seria a utilização da cefquinoma de administração intramuscular, a qual seria vantajosa para o tratamento de animais com múltiplos quartos infectados ou tratamento de animais positivos na cultura composta. Entretanto, a baixa taxa de cura bacteriológica da terapia intramuscular observada neste estudo (55%) não justifica a sua utilização, uma vez que as terapias intramamárias foram significativamente maiores (cefquinoma intramamária, 98%; cloxacilina intramamária, 86%).

A diferença observada entre o tratamento intramamário de *S. agalactiae* com cloxacilina em relação à cefquinoma (diferença na taxa de cura bacteriológica = 0,12) sugere que o tratamento com cloxacilina é ainda eficiente e não inferior ao tratamento com cefquinoma. Portanto, considerando-se as recomendações da OMS, o uso da cloxacilina intramamária seria adequado para o tratamento de *S. agalactiae* em programas de erradicação.

Nestes programas, os altos custos com identificação e tratamento dos animais infectados, associados ao descarte de leite, podem ser uma barreira à adesão dos produtores. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a utilização da cultura composta como estratégia de triagem dos rebanhos seria vantajosa à utilização da cultura individual por quarto. A sensibilidade da cultura composta foi de 89,7%, ou seja, 9 em cada 10 animais infectados seriam corretamente identificados, e os animais não diagnosticados inicialmente (falso-negativos) seriam potencialmente identificados em triagens subsequentes. Desta forma, o uso da cultura composta como estratégia de triagem, ao invés da cultura individual por quarto, reduziria os custos com o diagnóstico dos animais infectados a um quarto do seu valor, estimulando os produtores a aderirem aos programas de erradicação.

Tradicionalmente, uma vez que uma vaca fosse diagnosticada com *S. agalactiae* pela cultura composta, todos os quartos seriam tratados independentemente de seu *status* infeccioso. Para reduzir os custos com o tratamento e minimizar a exposição de quartos sadios à antimicrobianos, testes diagnósticos rápidos realizados na própria fazenda podem ser utilizados para identificação dos quartos infectados. Resultados deste estudo sugerem que o teste Somaticell (ponto de corte = 205.000 células/mL) pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica para identificação de quartos infectados por *S. agalactiae*. Somaticell apresentou apenas 2,9% de resultados falso-negativos e 20,4% de resultados falso-positivos. Ou seja, de 100 quartos realmente infectados, 3 seriam incorretamente

identificados como sadios e 20 seriam tratados desnecessariamente. Em contrapartida, o teste CMT (ponto de corte = escore 1) apresentou 9,2 e 9,9% de resultados falso-negativos e positivos, respectivamente, resultando em maior proporção de quartos diagnosticados incorretamente como sadios. Quartos infectados e não identificados representam um reservatório e fonte de infecção de *S. agalactiae* no rebanho, e podem rapidamente transmiti-lo para quartos sadios, comprometendo o programa de erradicação e frustrando o produtor. Portanto, a menor proporção de resultados falso-negativos do teste Somaticell justificaria a sua preferência como teste diagnóstico em programas de erradicação de *S. agalactiae*.

Estudos adicionais com uma abordagem econômica são necessários para avaliar qual a estratégia de identificação e tratamento que apresenta melhor custo-benefício para diagnóstico de animais e quartos infectados com *S. agalactiae*, e auxiliar o produtor na tomada de decisão em programas de erradicação de *S. agalactiae* em rebanhos leiteiros.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento de infecção intramamária causada por *S. agalactiae* com cloxacilina intramamária ainda é eficiente e não inferior ao tratamento com cefquinoma intramamária, considerando-se margens de não inferioridade de 0,20 e 0,25. Quartos tratados com cefquinoma intramuscular apresentaram a menor taxa de cura bacteriológica (55%) quando comparados ao tratamento com cloxacilina intramamária (86%) e cefquinoma intramamária (98%).

A triagem de rebanhos para identificação de vacas infectadas com *S. agalactiae* pode ser realizada por meio da cultura composta, uma vez que esta apresentou acurácia diagnóstica satisfatória quando comparada a cultura individual por quarto. Para identificação dos quartos infectados em uma vaca previamente diagnosticada com *S. agalactiae* pela cultura composta, o ponto de corte considerado mais adequado pelos autores foi de 205.000 células/mL para o teste Somaticell, e escore 1 para o teste CMT. O teste Somaticell foi considerado o mais apropriado para uso em programas de erradicação, pois apresentou alta sensibilidade e menor proporção de resultados falso-negativos, quando comparado ao CMT.

Os resultados deste estudo podem ser aplicados em programas de erradicação da mastite contagiosa causada por *S. agalactiae*. O desenvolvimento de novas estratégias de tratamento pode estimular a adesão dos produtores a estes programas e contribuir para melhoria da qualidade do leite nos rebanhos brasileiros.

REFERÊNCIAS

- AGGER. J. F.; PRIOU. C.; HUDA. A.; AAGAARD. K. Risk factors for transmission of *Streptococcus agalactiae* infection between Danish dairy herds: a case control study. *Veterinary Research*. v. 25. n. 2-3. p. 227-234. 1994.
- ANDERSEN. H. J.; PEDERSEN. L. H.; AARESTRUP. F. M.; CHRIÉL. M. Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*. v. 86. n. 4. p. 1233–1239. 2003.
- BARHEMA. H. W.; GREEN. M. J.; BRADLEY. A. J.; ZADOKS. R. N. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*. v. 92. n. 10. p. 4717–4729. 2009.
- BARTLETT. P. C.; MILLER. G. Y.; LANCE. S. E.; HEIDER. L. E. Use of bulk tank and milk filter cultures in screening for *Streptococcus agalactiae* and Coagulase-positive Staphylococci. *Journal of Food Protection*. v. 54. p. 848-851. 1991.
- BARTLETT. P. C.; MILLER. G. Y.; LANCE. S. E.; HANCOCK. D. D.; HEIDER. L. E. Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio. *American Journal of Veterinary Research*. v. 53. n. 9. p. 1715-1721. 1992.
- BRADLEY. A.; HUXLEY. J.; GREEN. M. A rational approach to dry cow therapy II: Making logical decisions. *In Practice*. v. 25. n. 1. p. 12-17. 2003.
- BRITO. M. A. V.; BRITO. J. R.; RIBEIRO. M. T.; VEIGA. V. M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: Exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 51. n. 2. p. 129-135. 1999.
- BROWN. J.; FARNSWORTH. R.; WANNAMAKER. L. W.; JOHNSON. D. W. CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows. *Infection and immunity*. v. 9. n. 2. p. 377-383. 1974.
- BROWN. M. B.; SCASSERRA. A. E. Antimicrobial resistance in streptococcal species isolated from bovine mammary glands. *American Journal of Veterinary Research*. v. 51. n. 12. p. 2015-2018. 1990.
- CASSOLI. L. D. Uma pergunta simples: A qualidade do leite tem melhorado nos últimos anos?. 2012. Disponível em: < <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/uma-pergunta-simples-a-qualidade-do-leite-tem-melhorado-nos-ultimos-anos-79994n.aspx>>. Acesso em: 05 out. 2016.

- CHUARD. C.; RELLER. L.B. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *Journal of clinical microbiology*. v. 36. n. 4. p.1135-1136. 1998.
- CRAVEN. N. Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation: A review. *The British Veterinary Journal*. v. 143. n. 5. p. 410-422. 1987.
- CRUPPE. L.H.; FOE. F.H.; FRANCO. F.; VASCONCELOS. C. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: 47^o Annual Meeting of the National Mastitis Council. 2008. New Orleans, Louisiana. *Anais*. Washington: National Mastitis Council. p. 218-219.
- DAVIS. W. T.; MAPLESDEN. D. C.; NATZKE. R. P.; PHILPOT. W. N. Sodium cloxacillin for treatment of mastitis in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. v. 58. n. 12. p. 1822-1827. 1975.
- DEGRAVES. F. J.; FETROW. J. Economics of mastitis and mastitis control. *The Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 9. n. 3. p. 421-34. 1993.
- DELUYKER. H. A.; CHESTER. S. T.; VAN OYE. S. N. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincomycin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v. 22. n. 4. p. 274-282. ago. 1999.
- DINSMORE. R. P.; ENGLISH. P. B.; GONZALEZ. R. N.; SEARS. P. M.; SCHULTE. H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. v. 74. n. 5. p. 1521-1526. 1991.
- DINSMORE. R. P.; ENGLISH. P. B.; GONZALEZ. R. N.; SEARS. P. M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. v. 75. n. 10. p. 2706-2712. 1992.
- DINSMORE. R. P. Biosecurity for mammary diseases in dairy cattle. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 18. n. 1. p. 115-131. 2002.
- DUARTE. R. S.; MIRANDA. O. P.; BELLEI. B. C.; BRITO. M. A. V. P.; TEIXEIRA. L. M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae*

- isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42. n. 9. p. 4214-4222. 2004.
- EBERHART. R. J.; HUTCHINSON. L. J.; SPENCER. S. B. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *Journal of Food Protection*. v. 45. p. 1125-1128. 1982.
- EDMONDSON. P. An economic justification of “blitz” therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. *The Veterinary Record*. v. 125. n. 24. p. 591-593. 1989.
- EDMONDSON. P. Blitz therapy and *Streptococcus agalactiae*. *Veterinary Record*. v. 166. n. 11. p. 342. 2010.
- EHINGER. A. M.; SCHMIDT. H.; KIETZMANN. M. Tissue distribution of cefquinome after intramammary and “systemic” administration in the isolated perfused bovine udder. *Veterinary Journal*. v. 172. n. 1. p. 147-153. 2006.
- ELIAS. A. O.; CORTEZ. A.; BRANDÃO. P. E.; SILVA. R. C.; LANGONI. H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*. v. 93. n. 1. p. 34-38. 2012.
- EMA. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICAL PRODUCTS. Cefquinome. Summary Report. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011877.pdf>. Acesso em: 10 out. 2016.
- ERSKINE. R. J.; EBERHART. R. J.; HUTCHINSON. L. J.; SPENCER. S. B. Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 190. n. 11. p. 1411-1416. 1987.
- ERSKINE. R. J.; EBERHART. R. J. Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of intramammary infections. *Journal of Dairy Science*. v. 71. n. 3. p. 854-856. 1988.
- ERSKINE. R. J.; EBERHART. R. J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 196. n. 8. p. 1230–1235. 1990.

- ERSKINE. R. J. Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. v. 14. n. 7. p. 969-979. 1992.
- ERSKINE. R. J.; WALKER. R. D.; BOLIN. C. A.; BARTLETT. P. C.; WHITE. D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science*. v. 85. n. 5. p. 1111-1118. 2002.
- FARNSWORTH. R.; STEWART. S. REID. D. Dealing with *Streptococcus agalactiae* Mastitis. *QUALITY COUNT\$ Seminars and Workshops*. 2003. Disponível em: <<https://www.qualitycounts.umn.edu/sites/qualitycounts.umn.edu/files/f-mc-2.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- FROST. A. J.; SANDERSON. C. J. Control and eradication of *Streptococcus agalactiae* infection in dairy herds. *Australian Veterinary Journal*. v. 41. p. 97-100. 1965.
- GIANNEECHINI. R.; CONCHA. C.; RIVERO. R.; DELUCCI. I.; LÓPEZ. J. M. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*. v. 43. n. 4. p. 221-230. 2002.
- GILLESPIE. B. E.; OLIVER. S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus uberis*. and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*. v. 88. n. 10. p. 3510-3518. 2005.
- GOLDBERG. J. J.; PANKEY. J. W.; DRECHSLER. P. A.; MURDOUGH. P. A.; HOWARD. D. B. An update survey of bulk tank milk quality in Vermont. *Journal of Food Protection*. v. 54. p. 549-553. 1991.
- GONZALEZ. R. N.; JASPER. D. E.; BUSHNELL. R. B.; FARVER. T. B. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 189. n. 4. p. 442-445. 1986.
- GONZALEZ. R. N.; JASPER. D. E.; FARVER. T. B.; BUSHNELL. R. B.; FRANTI. C. E. Prevalence of udder infections and mastitis in 50 California dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 193. n. 3. p. 323-328. 1988.
- GUTERBOCK, W. M.; BLACKMER, P. E. Veterinary interpretation of bulk tank milk. *Veterinary Clinics of North. America - Large Animal Practice*, v. 6, p.257-268, 1984.
- HAMANN, J.; REICHMUTH, J. Compensatory milk production within the bovine udder: effects of short-term non-milking of single quarters. v. 57, p. 17-22, 1990.

- HARROP. M. H. V.; PEREIRA. L. J. G.; BRITO. J. R. D.. MELLO. A. M. B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 10. p. 65-67. 1975.
- HOGAN. J. S.; PANKEY. J. W.; MURDOUGH. P.; HOWARD. D. B.. Survey of bulk tank milk using blood-esculin agar counts. *Journal of Food Protection*. v. 49. p. 990-993. 1987.
- HOGAN, J. S.; SMITH, K.L. Using bulk tank milk cultures in a dairy practice. National Mastitis Council Mastitis Microbiology Diagnostics Workshop. Arlington, Virginia, 1992.
- HORNISH. R. E.; KOTARSKI. S. F. Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v. 2. n. 7. p. 717-731. 2002.
- HORTET. P.; SEEGER. H. Review article Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows : review and critical discussion. *Veterinary Research*. v. 29. p. 497-510. 1998.
- KALMUS. P.; SIMOJOKI. H.; ORRO. T.; TAPONEN. S.; MUSTONEN. K.; HOLOPAINEN. J.; PYORALA. S. Efficacy of 5-day parenteral versus intramammary benzylpenicillin for treatment of clinical mastitis caused by gram-positive bacteria susceptible to penicillin in vitro. *Journal of Dairy Science*. v. 97. n. 4. p. 2155-64. 2014.
- KATHOLM. J.; BENNEDSGAARD. T. W.; KOSKINEN. M. T.; RATTENBORG. E. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. v. 95. p. 5702-5708. 2012.
- KEEFE. G. P. Streptococcus agalactiae mastitis: A review. *Canadian Veterinary Journal*. v. 38. n. 7. p. 429-437. 1997.
- KEEFE. G. P.; DOHOO. I. R.; SPANGLER. E. Herd prevalence and incidence of Streptococcus agalactiae in the dairy industry of Prince Edward Island. *Journal of dairy science*. v. 80. n. 3. p. 464-470. 1997.
- KEEFE. G. Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 28. n. 2. p. 203-216. 2012.

- KINGWILL. R. G.; NEAVE. F. K; DODD. F. H; GRIFFIN. T. K.; WESTGARTH. D. R. The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years. *Veterinary Record*. v. 87. p. 94-102. 1970.
- KOSKINEN. M. T.; HOLOPAINEN. J.; PYORALA. S.; BREDBACKA. P.; PITKALA. A.; BARKEMA. H. W.; BEXIGA. R.; ROBERSON. J.; SOLVERD. L.; PICCININI. R.; KELTON. D. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. v. 92. n. 3. p. 952-959. 2009.
- KOSKINEN. M. T.; WELLENBERG. G. J.; SAMPIMON. O. C.; HOLOPAINEN. J.; ROTHKAMP. A.; SALMIKIVI. L.; VAN-HAERINGEN. W. A.; LAM. T. J. G. M.; PYORALA. S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*. v. 93. n. 12. p. 5707-5715. 2010.
- LANGENEGGER. J.; COELHO. N. M.; LANGENEGGER. C. H.; CASTRO. R. P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do rio de janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 5. p. 437-440. 1970.
- LANGONI. H.; PENACHIO. D. D. S.; CITADELLA. J. C.; LAURINO. F.; FACCIOLI-MARTINS. P. Y.; LUCHEIS. S. B.; MENOZZI. B. D.; SILVA. A. V. D. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 31. n. 12. p. 1059-1065. 2011.
- LEELAHAPONGSATHON. K.; SCHUKKEN. Y. H.; SURIYASATHAPORN. W. Quarter. cow. and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Tropical Animal Health Production*. v. 46. p. 1067-1078. 2014.
- LEELAHAPONGSATHON, K.; SCHUKKEN, Y. H.; PINYOPUMMINTR, T.; SURIYASATHAPORN, W. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 1418-1426, 2016.
- LYHS, U.; KULKAS, L.; KATHOLM, J.; WALLER, K. P.; SAHA, K.; TOMUSK, R. J.; ZADOKS, R.N. *Streptococcus agalactiae* Serotype IV in Humans and Cattle, Northern Europe. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 12, p. 2097-2103, 2016.
- MARKEY. B.; LEONARD. F.; ARCHAMBAULT. M.; CULLINANE. A.; MAGUIRE. D. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2.ed. Elsevier. 2013. 901p.

- MA. Y.; RYAN. C.; BARBANO. D. M.; GALTON. D. M.; RUDAN. M. A.; BOOR. K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. v. 83. n. 2. p.264-274. 2000.
- MAKOVEC. J. A.; RUEGG. P. L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8.905 samples (1994-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 222. n. 11. p. 1582-1589. 1 jul. 2003.
- MCDOUGALL. S.; AGNEW. K. E.; CURSONS. R.; HOU. X. X.; COMPTON. C. R. W. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. v. 90. n. 2. p. 779-789. 2007.
- MELLO. P. L.; AGOSTINIS. R. O.; BARZON. E. M.; COLOMBO. R. B.; SILVA. A. V.; MARTINS. L. A. Prevalência da mastite subclínica e associações dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. *Veterinária e Zootecnia*. v. 19. n. 4. p. 513-521. 2012.
- MORSE. G. E. Evaluation of mastitis control program. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 170. n. 10. p. 1247-1250. 1977.
- MURDOUGH. P. A.; DEITZ. K. E.; PANKEY. J. W. Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *Journal of dairy science*. v. 79. n. 2. p. 334-336. 1996.
- MWEU. M. M.; TOFT. N.; KATHOLM. J.; NIELSEN. S. S. Evaluation of two herd-level diagnostic tests for *Streptococcus agalactiae* using a latent class approach. *Veterinary Microbiology*. v. 159. n. 1. p.181-186. 2012.
- MWEU. M. M.; NIELSEN. S. S.; HALASA. T.; TOFT. N. Spatiotemporal patterns. annual baseline and movement-related incidence of *Streptococcus agalactiae* infection in Danish dairy herds: 2000–2009. *Preventive veterinary medicine*. v. 113. n. 2. p. 219-230. 2014.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. A practical look at contagious mastitis. Disponível em: <<https://nmconline.org/contmast.htm>>. Acesso em: 25 jul. 2015a.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Using Bulk Tank Milk Cultures in a Dairy Practice. Disponível em: < <http://www.nmconline.org/articles/bulktank.htm>>. Acesso em: 31 jul. 2015b.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Recommended mastitis control program. Disponível em: <<https://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2015c.

- NATZKE. R. P.; EVERETT. R. W.; GUTHRIE. R. S.; KEOWN. J. F.; MEEK. A. M.; MERRILL. W. G.; ROBERTS. S. J.; SCHMIDT. G. H.. Mastitis control program: effect on milk production. *Journal of Dairy Science*. v. 55. n. 9. p. 1256-1260. 1972.
- NEAVE. F. K.; DODD. F. H.; KINGWILL. R. G.; WESTGARTH. D. R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *Journal of Dairy Science*. v. 52. n. 5. p. 696-707. 1969.
- ODIERNO. L.; CALVINHO. L.; TRAVERSSA. P.; LASAGNO. M.; BOGNI. C.; REINOSO. E. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *Journal of Dairy Science*. v. 89. n. 10. p.3886-3890. 2006.
- OLIVER. S. P.; GILLESPIE. B. E.; HEADRICK. S. J.; MOOREHEAD. H.; LUNN. P.; DOWLEN. H. H.; JOHNSON. D. L.; LAMAR. K. C.; CHESTER. S.T.; MOSELEY. W. M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 87. n. 8. p. 2393-2400. 2004.
- PITKALA. A.; HAVERI. M.; PYORALA. S.; MYLLYS. V.; HONKANEN-BUZALSKI. T. Bovine mastitis in Finland 2001: Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*. v. 87. n. 8. p. 2433-2441. 2004.
- POLITIS. I.; NG-KWAI-HANG. K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. *Journal of Dairy Science*. v. 71. n. 7. p. 1711-1719. 1988.
- PYORALA. S. Treatment of clinical mastitis: local and/or systemic? Short or long. In: 24° World Buiatrics Congress. 2006 Nice. France. *Anais. World Buiatrics Congress*. p. 250-259.
- PYORALA. S. Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*. v. 62. p. 40-44. 2009.
- QADRI. S.M.; SILVA. M.I.de; ZUBAIRI. S. Rapid test for determination of esculin hydrolysis. *Journal of clinical microbiology*. v. 12. n. 3. p.472-474. 1980.
- RAMÍREZ. N. F.; KEEFE. G.; DOHOO. I.; SÁNCHEZ. J.; ARROYAVE. O.; CERÓN. J.; JARAMILLO. M.; PALACIO. L. G. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the

- northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*. v. 97. p. 4141-4150. 2014.
- REYES. J.; CHAFFER. M.; SANCHEZ. J.; TORRES. G.; MACIAS. D.; JARAMILLO. M.; KEEFE. G. P. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. *Journal of Dairy Science*. v.98. p. 5294-5303. 2015.
- RIEKERINK. R. G. M. O.; BARKEMA. H. W.; VEENSTRA. S.; POOLE. D. E.; DINGWELL. R. T.; KEEFE. G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal*. v. 47. n. 6. p. 567-572. 2006.
- SANTOS. L. L.; PEDROSO. T. F. F.; GUIRRO. E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste. Paraná. *Ciência Animal Brasileira*. v. 11. n. 4. p. 860-866. 2010.
- SCHERPENZEEL, C. G. M.; den UIJL, I. E. M.; van SCHAIK, G.; RIEKERINK, R. O.; HOGEVEEN, H.; LAM, T. J. G. M. Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage, and economics. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 3753-3764, 2016.
- SCHUKKEN. Y. H.; BARKEMA. H. W.; LAM. T. J. G. M.; ZADOKS. R. N. Improving udder health on well managed farms: mitigating the “perfect storm”. Mastitis control: from science to practice. In: International Conference. The Hague. Netherlands. 2008. Anais. Wageningen Academic Publishers. 2008. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=a39A9I3yNO0C&oi=fnd&pg=PA21&dq=Improving+udder+health+on+well+managed+farms:+mitigating+the+%E2%80%9Cperfect+storm%E2%80%9D.Mastitis+control:+from+science+to+practice&ots=XPGa_wcVtk&sig=zaf2wxJuRrC2kItHOWuuccOzUo0#v=onepage&q=Improving%20udder%20health%20on%20well%20managed%20farms%3A%20mitigating%20the%20%E2%80%9Cperfect%20storm%E2%80%9D.Mastitis%20control%3A%20from%20science%20to%20practice&f=false Acesso em: 31 jul. 2015.
- SOL. J.; SAMPIMON. O. C.; SNOEP. J. J.; SCHUKKEN. Y. H. Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. *Journal of Dairy Science*. v. 77. n. 1. p. 75-79. 1994.

- SOL. J.; SAMPIMON. O. C.; SNOEP. J. J. and Schukken. Y.H. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of dairy science*. v. 80. n. 11. p. 2803-2808. 1997.
- SOUZA. G. N.; BRITO. J. R.; MOREIRA. E. C.; BRITO. M. A. V.; SILVA. M. V. G. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 61. n. 5. p. 1015-1020. 2009.
- THURMOND. M. C.; TYLER. J. W.; LUIZ. D. M.; HOLMBERG. C. A.; PICANSO. J. P. The effect of pre-enrichment on recovery of *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and mycoplasma from bovine milk. *Epidemiology and Infection*. v. 103. n. 3. p. 465-474. 1989.
- TYLER. J. W.; WILSON. R. C.; DOWLING. P. Treatment of subclinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 8. n. 1. p. 17-28. 1992.
- VILLANUEVA. M. R.; TYLER. J. W.; THURMOND. M. C. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 198. n. 8. p. 1398–1400. 15 abr. 1991.
- WEAVER. L. D.; GALLAND. J.; MARTIN. P. A.; VERSTEEG. J. T. reatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 189. n. 6. p. 666-669. 1986.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine, third revision. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en/>>. Acesso em: 6 out. 2016.
- WILSON. C. D.; WESTGARTH. D. R.; KINGWILL. R. G.; GRIFFIN. T. K.; NEAVE. F. K.; DODD. F. H. Effect of infusion of sodium cloxacilin in all infected quarters of lactating cows in sixteen herds. *British Veterinary Journal*. v. 128. p. 71-85. 1972.
- WILSON. D. J.; GONZALEZ. R. N.; DAS. H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*. v. 80. n. 10. p. 2592-2598. 1997.

- WILSON. D. J.; GONZALEZ. R. N.; CASE. K. L.; GARRISON. L. L.; GROHN. Y. T.
Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. v. 82. n. 8. p. 1664-1670. 1999.
- YAMAGATA. M.; GOODGER. W. J.; WEAVER. L.; FRANTI. C. The economic benefits of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 191. n. 12. p. 1556-1561. 1987.
- YANG Y.; LIU. Y.; DING. Y.; YI. L.; MA. Z.; FAN. H.; LU. C. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in eastern China. *Plos one*. v. 8. p. e67755. 2013.
- ZONCA. A.; GALLO. M.; LOCATELLI. C.; CARLI. S.; MORONI. P.; VILLA. R.; CAGNARDI. P. Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. *Journal of Dairy Science*. v. 94. n. 7. p. 3455-3461. 2011.

ANEXO I – Normas de Publicação da revista *Journal of Dairy Science*