

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA PARA A
PREDIÇÃO DA ETIOLOGIA INFECCIOSA DA MASTITE
SUBCLÍNICA BOVINA EM SISTEMA DE ORDENHA
ROBÓTICO COM O USO DE TÉCNICAS DE APRENDIZADO
DE MÁQUINA**

Fernando David Caracuschanski

Médico veterinário

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA PARA A
PREDIÇÃO DA ETIOLOGIA INFECCIOSA DA MASTITE
SUBCLÍNICA BOVINA EM SISTEMA DE ORDENHA
ROBÓTICO COM O USO DE TÉCNICAS DE APRENDIZADO
DE MÁQUINA**

Fernando David Caracuschanski

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Veterinárias.

2023

C257u	<p data-bbox="443 1417 762 1440">Caracuschanski, Fernando David</p> <p data-bbox="443 1458 1189 1599">Uso da termografia infravermelha para a predição da etiologia infecciosa da mastite subclínica bovina em sistema de ordenha robótico com o uso de técnicas de aprendizado de máquina / Fernando David Caracuschanski. -- Jaboticabal, 2024</p> <p data-bbox="467 1617 579 1639">50 p. : tabs.</p> <p data-bbox="443 1697 1201 1760">Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p data-bbox="467 1778 798 1800">Orientador: Luiz Francisco Zafalon</p> <p data-bbox="443 1859 1166 1921">1. Doenças Transmissíveis em Animais. 2. Industria Laticínios. 3. Células Imunocompetentes. 4. Aprendizado do Computador. 5. Microorganismos. I.</p> <p data-bbox="443 1939 502 1962">Título.</p>
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA PARA A PREDIÇÃO DA ETIOLOGIA INFECCIOSA DA MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM SISTEMA DE ORDENHA ROBÓTICO COM O USO DE TÉCNICAS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA

AUTOR: FERNANDO DAVID CARACUSCHANSKI

ORIENTADOR: LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON (Participação Virtual)
EMBRAPA Pecuária Sudeste (CPPSE) / Sao Carlos/SP

Documento assinado digitalmente
LUIZ FRANCISCO ZAFALON
Data: 30/10/2023 17:06:19-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA UNESP Aracatuba

Documento assinado digitalmente
IVERALDO DOS SANTOS DUTRA
Data: 31/10/2023 13:18:11-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Prof. Dr. ANDERSON LUIZ ARA SOUZA (Participação Virtual)
Universidade Federal do Paraná (UFPR) / Curitiba/PR

Documento assinado digitalmente
ANDERSON LUIZ ARA SOUZA
Data: 31/10/2023 11:36:18-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Jaboticabal, 30 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernando David Caracuschanski, natural da cidade do Rio de Janeiro, RJ é Médico Veterinário graduado pela Universidade Castelo Branco (2021). Durante a graduação fez estágios nas áreas de bovinocultura leiteira e qualidade microbiológica e físico-química de alimentos nos Centros de Pesquisa em Agricultura Orgânica (CEPAO) e de Pesquisa em Qualidade de Alimentos (CEPQA), nos municípios de Seropédica, RJ e Niterói, RJ respectivamente, ambos pertencentes a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO). Desenvolveu e foi bolsista do projeto de iniciação científica intitulado: “Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado na praia de Copacabana, RJ”. Foi monitor das disciplinas de Melhoramento animal e Estágio Supervisionado em Medicina Veterinária. No mesmo ano de formatura ingressou no Mestrado em Ciências Veterinárias na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP) Campus de Jaboticabal, SP, concluindo em 2023.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento vai ao meu orientador, Luiz Francisco Zafalon, que me recebeu de braços abertos e confiou em mim desde meu primeiro e-mail em que demonstrei interesse em participar do processo seletivo de Mestrado. Agradeço muito, pois durante estes dois anos de pós-graduação você me incentivou e apontou meus erros sempre visando o meu crescimento profissional. Graças ao Luiz, hoje sinto que meu pensamento crítico, minha redação e meus métodos de pesquisa foram bastante aprimorados.

Gostaria de agradecer aos meus pais Ari e Reneé que sempre me forneceram as melhores condições para estudar e estar aqui hoje, além de sempre me incentivarem, amo vocês!

Minhas irmãs Debora e Mina, que mesmo com a distância não deixaram de lado a comunicação e sempre acreditarem em mim.

Minha tia Célia e meu tio Armando, por desde pequeno me influenciarem ao caminho da ciência.

Minha avó Adélia (*In memoriam*) que sempre sonhou em ver seu neto se formando, hoje para a sua alegria, se torna Mestre.

A UNESP pelo meu crescimento pessoal e profissional durante as aulas de pós-graduação e em todo o período de Mestrado.

A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, em especial as pesquisadoras Teresa Cristina Alves e Simone Cristina Méo Niciura, e meus colegas, Raul Costa Mascarenhas Santana, Larissa Cristina Brassolatti e Maria Laura da Silva, vocês foram primordiais para a realização deste trabalho, muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento:01

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - FAPESP: Processo nº 2020/16240-4

E à CNPq: 404513/2021-2

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA).....	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão de literatura.....	4
1.2.1 Ordenha robótica.....	4
1.2.2 Mastite bovina.....	5
1.2.3 Principais agentes etiológicos.....	6
1.2.4 Diagnóstico microbiológico da mastite bovina.....	7
1.2.5 Principais métodos diagnóstico da mastite subclínica bovina.....	10
1.2.6 Aprendizado de máquina.....	12
CAPÍTULO 2 - Use of infrared thermography for predicting the infectious etiology of subclinical bovine mastitis in a robotic milking system using machine learning.....	19

USO DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA PARA A PREDIÇÃO DA ETIOLOGIA INFECCIOSA DA MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM SISTEMA DE ORDENHA ROBÓTICO

RESUMO - A mastite é responsável por grandes prejuízos para produtores e indústrias devido a diminuição da qualidade e quantidade do leite produzido. A ordenha robótica surge como uma alternativa à escassez de mão de obra, entretanto a higienização dos tetos neste sistema pode ser ineficiente possibilitando o surgimento e a manutenção de casos de mastite no rebanho. Inexistem informações a respeito da eficiência da higienização dos tetos neste sistema em rebanhos mantidos a pasto. A utilização de técnicas precisas e rápidas de diagnóstico são fundamentais para o controle da mastite e a termografia infravermelha é um dos meios potenciais que podem ser usados para a identificação de uma vaca com a doença, devido a capacidade dos microrganismos em elevar a temperatura do úbere. Entretanto, este método sofre grandes variações devido a fatores dos animais e ambientais. O uso do aprendizado de máquina pode aprimorar o diagnóstico termográfico por meio da identificação de padrões, acelerando a tomada de decisões clínicas. Assim, objetivou-se avaliar a termografia infravermelha para a predição da etiologia infecciosa da mastite subclínica bovina com o uso de técnicas de aprendizado de máquina, em sistema de ordenha voluntária de vacas criadas a pasto. Oitenta e nove vacas em lactação de uma propriedade rural de São Carlos, SP, Brasil foram submetidas durante seis meses a análises termográficas do úbere, exame microbiológico, avaliação dos teores de gordura e contagem de células somáticas das amostras de leite. Foram coletados dados como estágio de lactação, paridade, data e hora da ordenha e índice de sujidade dos quartos mamários. A ocorrência de sol ou chuva durante a obtenção das amostras foram devidamente registradas e sensores programados para o monitoramento da temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram utilizados. As análises dos dados foram realizadas no *software* R (versão 4.2.3.), utilizou-se técnicas supervisionadas de aprendizado de máquina (*supervised machine learning*), com a finalidade de predição da mastite e da etiologia infecciosa com o uso da termografia infravermelha. Modelos de regressão logística binomial e multinomial foram utilizados e comparados. Espera-se, com os resultados obtidos, a obtenção de mais informações sobre a capacidade diagnóstica da termografia infravermelha, de modo que sejam proporcionados subsídios futuros a produtores e assistência técnica especializada sobre a identificação de casos subclínicos de mastite bovina em sistemas de ordenha robotizados.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas, leite, Microbiologia, Rebanho.

USE OF INFRARED THERMOGRAPHY FOR THE PREDICTION OF THE INFECTIOUS ETIOLOGY OF BOVINE SUBCLINICAL MASTITIS IN ROBOTIC MILKING SYSTEMS

ABSTRACT - Mastitis is responsible for significant losses for producers and industries due to the decrease in the quality and quantity of milk produced. Robotic milking emerges as an alternative to the shortage of labor, however teat hygiene in this system can be inefficient, making it possible for mastitis cases to arise and persist in the herd. There is no information about the efficiency of teat hygiene in this system in herds kept on pasture. The use of accurate and rapid diagnostic techniques are essential for mastitis control, and infrared thermography is one of the potential methods that can be used to identify a cow with the disease due to the ability of microorganisms to raise udder temperature. However, this method suffers from large variations due to factors of the animals and the environment. The use of machine learning can improve thermal diagnosis by identifying patterns, accelerating clinical decision-making. Thus, the objective was to evaluate infrared thermography for the prediction of the infectious etiology of subclinical bovine mastitis by machine learning techniques in a voluntary milking system of cows raised on pasture. Eighty-nine lactating cows from a rural property in São Carlos, SP, Brazil were subjected for six months to udder thermographic analyses, microbiological examination, assessment of fat levels and somatic cell count of milk samples. Data such as lactation stage, parity, date and time of milking and mammary quarter cleanliness index were collected. The occurrence of sun or rain during the collection of samples was duly recorded and sensors programmed for monitoring ambient temperature and relative humidity were used. Data analyses were performed in the R software (version 4.2.3.), using supervised machine learning techniques (supervised machine learning), with the purpose of predicting mastitis and the infectious etiology with the use of infrared thermography. Binomial and multinomial logistic regression models were used and compared. It is expected that, with the results obtained, more information will be obtained about the diagnostic capacity of infrared thermography, so that future subsidies will be provided to producers and specialized technical assistance on the identification of subclinical cases of bovine mastitis in robotic milking systems.

Keywords: Somatic Cell Count, Milk, Microbiology, Herd.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO CEUA PRT Nº 04/2021

Certificamos que o projeto de Pesquisa intitulado: “Desenvolvimento de algoritmos de aprendizado de máquina para o diagnóstico da mastite subclínica bovina por termografia infravermelha”, sob responsabilidade do pesquisador científico Dr. Luiz Francisco Zafalon, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste.

(We hereby declare that the research project titled “Development of machine learning algorithms for the diagnosis of bovine subclinical mastitis by infrared thermography” has been registered under the responsibility of Dr. Luiz Francisco Zafalon involving production, management or utilization of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans). The described experimental protocol is in accordance to the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (#11.794, enacted on 8th October 2008), to the Decree 6.899 (enacted on 15th July 2009) and the corresponding rules of National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and it was approved by the Committee of Animal Experimentation of Embrapa Southeast Livestock.)

São Carlos, 13 de Outubro de 2021.


Dr. Alexandre Rossetto Garcia
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/06/2021 a 31/05/2023
Espécie / Linhagem / Raça	Bovino / Bos taurus / Holandesa e Jersolanda
Número de Animais	60
Peso / Idade	Em fase de lactação
Sexo	Fêmea
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-5600
E-mail: cppse.ceua@embrapa.br

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

A diminuição da lucratividade e o aumento dos custos com a mão-de-obra têm motivado produtores de leite a tornar o sistema de produção mais rentável (De Koning, 2011). A adesão a novas tecnologias, como a automatização e a pecuária de precisão tem contribuído para o crescimento dessa rentabilidade. De acordo com Bach e Cabrera (2017) a produção leiteira no Brasil vem passando por modificações com a introdução de novas tecnologias, tais como a ordenha robotizada que tem contribuído para mudanças significativas na atividade.

A ordenha robotizada promove automação completa de todo o processo da ordenha e ocorre de forma voluntária, desta forma a vaca acessa as instalações sem interferência humana (Ferland et al., 2016; Tse et al., 2017). Entretanto, aspectos de manejo podem prejudicar a obtenção de um produto com a qualidade adequada. Por exemplo, a higienização dos tetos pode ser ineficiente, possibilitando o surgimento e a manutenção de casos de mastite clínica e subclínica no rebanho (Hovinen; Pyorala, 2011; Ohnstad et al., 2012). Desconhece-se se os processos de higienização pré e pós-ordenha também podem ser ineficientes em vacas sob ordenha robotizada criadas a pasto.

A mastite é uma importante enfermidade que acomete os animais de rebanhos leiteiros ocasionando grandes perdas econômicas para os produtores e laticínios (Kim et al., 2019). Tal enfermidade pode ser diferenciada de acordo com a manifestação da doença em clínica ou subclínica, a primeira com sinais inflamatórios aparentes no úbere e/ou alterações do leite secretado, enquanto a forma subclínica não apresenta sinais macroscópicos visíveis de alterações na glândula mamária e no leite.

A mastite também pode ser classificada conforme o agente etiológico em ambiental ou contagiosa (Lopes et al., 2018). A mastite ambiental é ocasionada por microrganismos oportunistas que se estabelecem no ambiente de ordenha e pode ser transmitida, principalmente, durante o período entre as ordenhas, quando as vacas se deitam em locais contaminados. Os patógenos relacionados são

principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes agentes normalmente estão relacionados a quadros clínicos de mastite (Lopes et al., 2018).

A forma contagiosa da doença é relacionada com a falta de práticas adequadas de higiene durante o momento da ordenha e é considerada a forma mais comum de casos subclínicos, causados principalmente por bactérias como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* (Lopes et al., 2018).

O diagnóstico rápido da mastite subclínica auxilia no controle da qualidade higiênico-sanitária do leite, na redução de perdas na produção e no bem-estar animal, uma vez que existe a possibilidade de evolução de casos subclínicos a clínicos. Assim, o diagnóstico eficaz e ágil da doença também contribui com a redução do uso de substâncias antimicrobianas que podem acarretar resíduos no leite e favorecer o desenvolvimento de resistência microbiana (Sinha et al., 2018).

Dentre os métodos diagnósticos da mastite subclínica, o “California Mastitis Test” (CMT) (Schalm e Noorlander, 1957) é um método indireto de avaliação quantitativa de células somáticas do leite nas vacas em lactação. Apesar de apresentar fácil execução, baixo custo, rapidez e exatidão nos resultados (Ruegg, 2017), apresenta subjetividade às leituras das reações (Lima et al., 2018).

Sinha et al. (2018) alertaram que os métodos diagnósticos da mastite subclínica são fundamentais aos produtores e responsáveis pela assistência técnica para a tomada de decisões nas propriedades rurais. A termografia infravermelha é reconhecida por conferir respostas imediatas no local de ordenha das vacas, uma vez que o aumento da temperatura do úbere é uma das primeiras alterações observados na mastite subclínica. O agente etiológico envolvido no processo infeccioso pode afetar diretamente nessas alterações, provocando a elevação da temperatura do úbere em até 1,05°C (Sathiyabarathi et al., 2016).

As concentrações de radiação infravermelha emitidas podem ser afetadas pela luz solar, umidade, sujidades, condições meteorológicas (Sathiyabarathi et al., 2016; Sinha et al., 2018), bem como pelo teor de gordura do leite, já que este é o componente lácteo que mais sofre variações (Cardoso et al., 2017). A correlação entre o teor de gordura e a eficiência diagnóstica da termografia infravermelha é pouco estudada em medicina veterinária, entretanto em medicina humana estudos como os de Chudecka, Lubkowska (2012) e Bandeira et al. (2017) evidenciaram

uma correlação negativa entre o percentual de gordura e a temperatura avaliada pelo termógrafo, visto que tal componente apresenta baixa condutividade térmica com perfil de isolante térmico (Guyton e Halh, 2006).

O estudo de técnicas que considerem a relação das diferentes variáveis que podem influenciar no diagnóstico da mastite subclínica por meio da termografia infravermelha pode aprimorar os resultados e levar à identificação de padrões, facilitando e acelerando o diagnóstico e a tomada de decisões (Jabour et al., 2022).

O aprendizado de máquinas pode ser uma dessas técnicas, pois consiste na capacidade do sistema em adquirir habilidades de maneira autônoma ao extrair padrões de grandes bancos de dados, conhecidos como Big Data. Na área da saúde, a quantidade de dados criados pode contribuir ainda mais com a acurácia de ferramentas que usam o aprendizado de máquinas (Topol, 2019).

As diferentes técnicas de aprendizado de máquinas têm sido utilizadas com maior frequência nos últimos anos, inclusive associadas à termografia infravermelha para o diagnóstico da mastite subclínica bovina (Zaninelli et al., 2019; Watz et al., 2019). A utilização destes métodos em conjunto favorece a automatização do processo de monitoramento da mastite por meio de modelos preditivos.

Desta forma, a detecção da mastite subclínica em estágios iniciais pode ser útil de modo a auxiliar posteriormente a identificação do agente etiológico e a consequente tomada de ações sobre os fatores ambientais ou contagiosos que propiciam o seu aparecimento, colaborando para a aplicação de medidas de manejo específicas (Hyde et al., 2020). A condução do presente projeto de pesquisa visou avaliar a termografia infravermelha como método de diagnóstico da etiologia infecciosa da mastite subclínica por meio de técnicas de aprendizado de máquina, além da sua relação com a gordura, constituinte do leite capaz de interferir nos resultados do teste.

A capacidade da termografia em fornecer resultados confiáveis de acordo com a etiologia infecciosa da mastite poderá fornecer informações in loco aos técnicos responsáveis pelo acompanhamento da saúde da glândula mamária em rebanho sob ordenha voluntária, visando otimização diagnóstica da doença. Espera-se, com os resultados obtidos, a obtenção de mais informações sobre a capacidade diagnóstica da termografia infravermelha, de modo que sejam proporcionados subsídios futuros a produtores e assistência técnica especializada sobre a identificação de casos subclínicos de mastite bovina em sistemas de ordenha

robotizados.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Ordenha robótica

Produtores de leite são atraídos por novas tecnologias devido a desafios encontrados na produção leiteira, dentre eles, a escassez de mão de obra qualificada. De acordo com Bach e Cabrera (2017) a ordenha robótica é uma tecnologia moderna, que vem sendo admitida por um número crescente de produtores. Os primeiros sistemas comerciais surgiram em 1992 e até 2017, mais de 42 mil ordenhas robotizadas foram instaladas em propriedades em todo o mundo (Tse et al., 2017).

A ordenha robótica ocorre de forma voluntária, desta forma a vaca acessa as instalações sem interferência humana, garantindo automação das etapas de ordenha (Ferland et al., 2016; Tse et al., 2017). Após a identificação eletrônica do animal, a porteira de acesso à ordenha é liberada e o sistema analisa se a vaca precisa ser ordenhada naquele momento. Em caso afirmativo, o alimento concentrado é liberado e o processo de ordenha é iniciado (Maculan e Lopes, 2016). Durante este processo, o braço robótico identifica o úbere e o posicionamento dos tetos de acordo com uma combinação de três eixos lineares de referência: X, Y e Z. Duas abordagens são utilizadas: a primeira é a determinação da posição aproximada do úbere, enquanto a segunda é identificar a posição precisa de cada teto. Adicionalmente, é utilizado pelo sistema um sensor de triangulação ótica que é baseado na reflexão de feixes de luz infravermelha que efetiva os posicionamentos, garantindo que a cor dos tetos não interfira nas avaliações (Cattaneo et al., 1996).

Maculan e Lopes (2016) relataram que após a identificação do posicionamento dos tetos, estes podem ser lavados com jatos de água e secos com ar ou submetidos à limpeza mecânica. Posteriormente, o braço mecânico acomoda a teteira nos tetos para o início da ordenha. A remoção automática das teteiras ocorre quando o fluxo de leite diminui em níveis pré-determinados. Solução emoliente é aplicada em cada teto após a ordenha, garantindo proteção ao canal do teto (Ohnstad et al., 2012).

Os sensores do equipamento de ordenha robótica monitoram e registram de

forma autônoma o volume produzido de leite, parâmetros de qualidade, composição do leite, frequência de ordenha dos animais, além de analisar a condição de saúde do úbere, desta forma mantendo um banco de dados no sistema (Maculan e Lopes, 2016). Entretanto, segundo Jacobs e Siegford (2012), o equipamento apresenta dificuldades em relação à identificação de sujidades nos tetos dos animais após a limpeza pré-ordenha, o que pode ser um fator agravante para a proliferação de microrganismos no interior do úbere e o surgimento de enfermidades, como a mastite.

Segundo Hovinen e Pyorala (2011), a detecção da mastite clínica e subclínica são um desafio para os sistemas de ordenha robótica, visto que a presença de um responsável atento à interpretação dos dados de saúde do úbere do rebanho, assim como a identificação dos primeiros sinais e sintomas continua imprescindível para a eliminação de casos.

A ordenha robótica está entre as cinco tecnologias de pecuária de precisão a serem mais adotadas até 2025 (Gargiulo et al., 2018). Apesar do grande número de benefícios do sistema em relação ao trabalho e à produtividade, a adoção permanece abaixo de 1 % em sistemas de criação extensivos (Lyons et al., 2014). Este fato pode estar relacionado a escassez de estudos sobre ordenha robótica cujo animais são manejados a pasto (Salfer et al., 2017).

1.2.2 Mastite bovina

A mastite é uma importante enfermidade que acomete os animais de rebanhos leiteiros com prevalências de até 46% (Busanello et al., 2017), ocasionando grandes perdas econômicas para os produtores e indústrias (KIM et al., 2019). Tais perdas são provenientes dos custos direcionados ao tratamento dos animais, bem como com a diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido, visto que em decorrência ao processo inflamatório ocorre a diminuição de constituintes do leite como a caseína e lactose (Oliveira et al., 2020).

A mastite de origem infecciosa é a mais comum e ocorre devido ao desequilíbrio na tríade epidemiológica, que envolve a interação entre animal, agente microbiano e meio ambiente (Martins et al., 2015), proporcionando a entrada de microrganismos por meio do canal do teto até alcançar os alvéolos. A sintomatologia será dependente dos fatores intrínsecos do agente infeccioso em aderir, colonizar e

multiplicar-se dentro da glândula mamária, assim como a capacidade de defesa do animal. Por fim, ocorre a substituição do tecido glandular funcional por tecido conjuntivo fibroso (Lange et al., 2017; Fox, Jiang e Gobius, 2018).

A enfermidade pode ser classificada em clínica ou subclínica levando em conta a caracterização das manifestações clínicas apresentada pelo animal. Na mastite clínica, o animal apresenta sinais evidentes de inflamação, tais como: algesia, edema, endurecimento da mama e hipertermia, podendo ainda evoluir para um quadro sistêmico ou ainda estarem associados a alterações do leite como a presença de grumos. Na forma subclínica da doença não há sinais aparentes, no entanto há a geração de maiores impactos financeiros, sendo estas perdas estimadas em 20% da produção de leite (Fox, Jiang e Gobius, 2018) devido à redução da qualidade e da quantidade de leite produzida.

1.2.3 Principais agentes etiológicos

As mastites podem ser classificadas em contagiosas e ambientais de acordo com a etiologia infecciosa da doença. As contagiosas são representadas principalmente por casos subclínicos e são caracterizadas por quadros crônicos e de longa duração. Os microrganismos envolvidos são adaptados à sobrevivência no úbere como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, que habitam e se multiplicam próximo ou no interior da glândula mamária. A sua transmissão ocorre entre os animais durante a ordenha, pelo ordenhador e/ou equipamentos de ordenha (Lopes et al., 2018).

Os agentes ambientais têm como habitat currais e locais de criação dos animais, e normalmente a infecção por estes microrganismos ocorre no período entre as ordenhas. A ocorrência de mastite ambiental está normalmente associada a falhas de manejo e/ou diminuição da imunidade do animal, tendo como principais agentes responsáveis: *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Prototheca zopfii*, leveduras e fungos (Lopes et al., 2018).

A identificação da etiologia infecciosa da mastite é de suma importância, visto que alguns microrganismos responsáveis pela enfermidade apresentam relevante papel em saúde pública por serem patogênicos aos seres humanos e apresentarem a habilidade de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos rotineiramente utilizados em medicina veterinária e humana (Malachowa et al., 2016; Oliveira,

Borges e Simões, 2018).

1.2.4 Diagnóstico microbiológico da mastite bovina

A identificação do agente etiológico da mastite é essencial para o tratamento e profilaxia de novas infecções, visto que revela informações sobre a origem e cadeia de transmissão do microrganismo (Santos; Fonseca, 2019)

A cultura microbiológica é considerada o método padrão-ouro para diagnóstico de infecção na glândula mamária. Para que a análise se torne eficiente devem ser utilizados critérios para a seleção das vacas que serão submetidas à coleta de amostras. Ferramentas auxiliares de diagnóstico são úteis como a CCS individual, CMT, WMT, CE e TIV, desta forma identificando o(s) quarto(s) afetado(s) para a coleta do leite (Santos; Fonseca, 2019).

A cultura microbiológica, em sua grande maioria, ocorre em laboratórios especializados, porém a cultura na fazenda é uma alternativa viável para suprir questões logísticas com o benefício de diminuir o tempo entre a coleta da amostra, o diagnóstico e a tomada de decisões (Bianchi et al., 2019).

As ferramentas moleculares de diagnóstico microbiológico fornecem resultados dentro de 24 horas, enquanto a cultura convencional pode demorar até uma semana, a depender do microrganismo envolvido na etiologia do caso (Adkins; Middleton, 2018). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método capaz de identificar a presença do DNA de um microrganismo no leite mesmo em baixas concentrações na amostra e independente da viabilidade do agente (Britten, 2012). Embora custosa, permite o diagnóstico acurado de espécies bacterianas de difícil isolamento por meio da cultura convencional (Ashraf et al., 2017; Salina et al., 2020). Entretanto, os resultados desta técnica devem ser interpretados de forma cautelosa, já que bactérias inviáveis detectadas podem não intervir em aplicabilidade clínica (Ashraf et al., 2017).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica de precisão desenvolvida no princípio do século XX, baseada na identificação e quantificação de compostos a partir da determinação da relação massa/carga (m/z) de estruturas químicas ionizadas em fase gasosa. Na década de 1970, pesquisadores como Anhalt e Fenselau (1975) aplicaram a técnica de espectrometria de massa combinada com a técnica de pirólise sobre bactérias Gram-positivas. Esta

associação resultou na formação de espectros a partir de moléculas de baixo peso molecular submetidas à pirólise, como fosfolipídeos e ubiquinonas, oriundas da membrana plasmática dos microrganismos. Nessa época, pesquisadores encontravam empecilhos em utilizar a espectrometria de massa, principalmente em relação ao laser irradiado sobre as amostras que levava a hidrólise das moléculas de proteínas, comprometendo a integridade original.

Tanaka et al. (1988) relataram que a introdução de proteínas em matrizes capazes de protegê-las desses danos minimizou as dificuldades com essa técnica diagnóstica. Com o desenvolvimento da ionização por dessorção a laser assistido por matriz, (matrix assisted laser desorption ionization – MALDI), a espectrometria de massa que era utilizada basicamente em estudos químicos, passou a ser amplamente empregada na análise de grandes moléculas biológicas, como em estudos bacteriológicos. A partir dos anos 1990, a técnica passou a ser utilizada de forma ampla para tal objetivo. Os espectros formados pela análise de microrganismos por MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) passaram a ser obtidos de forma mais simples e rápida, devido à irrelevância de se realizar pré-tratamentos das células presentes na amostra.

Bactérias passaram a ser analisadas diretamente da própria Unidade Formadora de Colônias - UFC, sendo estas adicionadas à matriz e introduzidas no espectrômetro (Holland et al., 1996). O espectrômetro de massa é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector de íons e um sistema de banco de dados (Cantú et al., 2008).

Inicialmente, a amostra a ser analisada necessita ser tratada com uma matriz constituída por uma solução de compostos orgânicos com alta capacidade de absorção de energia. A solução matriz é composta de água, um ácido forte e uma mistura de solventes orgânicos contendo etanol, metanol ou acetonitrila, que permitem a extração das proteínas intracelulares (Horneffer et al., 2001).

De acordo com Horneffer et al. (2001), com a secagem da matriz, ocorre a cocrystalização da amostra, em sequência, um raio laser é emitido sobre a amostra, e a absorção dessa energia pela matriz desencadeia os processos de dessorção e ionização do analito. Os íons protonados são acelerados em tubo a vácuo, onde se separam em função da proporção m/z . Com tal segregação, os analitos carregados podem ser detectados e mensurados, de acordo com seus tempos de voo “time-of-

flight” (TOF) no decorrer do tubo, visto que o tempo de deslocação até o detector está diretamente relacionada à massa dos íons (Singhal et al., 2015).

O princípio TOF é baseado no fato de que, quando elementos são ionizados, estes possuem a mesma carga e suas velocidades serão inversamente proporcionais à raiz quadrada de suas massas. Desta forma, os tempos de voos dos diferentes analitos serão determinados pelas suas massas, sendo que, quanto menor a relação m/z , mais rápido o íon atingirá o detector. O tempo de voo obtido pelos diferentes elementos ionizados gera um espectro característico de cada amostra, denominado de impressão digital de massa de peptídeos “peptide mass fingerprint” (PMF). Para tal formação são consideradas partículas com massa entre 2 a 20 kDa. Nesta faixa, as proteínas ribossomais dos microrganismos representam 60 a 70% da matéria seca de uma célula (Wattal et al., 2017).

Angeletti (2017) expôs que cerca de 50 proteínas ribossomais podem ser identificadas em microrganismos. A identificação destes é realizada comparando o PMF obtido na análise com os PMF’s contidos no banco de dados. Atualmente, existem quatro bancos de dados comerciais de MALDI-TOF MS: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Alemanha) Andromas (Andromas, Paris, França) e VitekMS (bioMérieux, Marcy l’Etoile, França) (Posteraro et al., 2013).

O MALDI-TOF apresenta vantagens, quando comparado a técnicas moleculares e imunológicas, como a velocidade e a acurácia dos resultados obtidos. Embora a aquisição do equipamento necessite de alto investimento inicial, o custo da análise por MALDI-TOF MS é mais acessível (Singhal et al., 2015). De acordo com Barreiro (2010) esta técnica pode ser considerada a principal ferramenta analítica em proteômica, devido à elevada sensibilidade, exatidão e precisão. Vale ressaltar que mais de 90% das amostras bacterianas são identificadas em nível de espécie e 98% em nível de gênero, enquanto apenas menos de 1% são identificadas incorretamente (Murray, 2012).

O MALDI-TOF MS também pode se apresentar como uma alternativa viável para a identificação de microrganismos isolados no leite, potencialmente causadores de mastite, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia Coli*, *Enterococcus* spp., *Trueperella pyogenes*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella multocida*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. e *Candida* spp. (Svennesen et al., 2018; Neste cenário, a espectrometria de massa MALDI-

TOF MS é uma metodologia que tem se mostrado muito promissora no atendimento desses quesitos (Nonnemann et al., 2019).

1.2.5 Principais métodos diagnósticos da mastite subclínica

O diagnóstico rápido da mastite subclínica auxilia no controle da qualidade higiênico sanitária do leite; redução de perdas na produção e no bem-estar animal (Oliveira, Borges e Simões, 2018). As formas de diagnóstico da mastite subclínica mais comuns se baseiam em métodos auxiliares como o “California Mastitis Test” (CMT), “Wisconsin Mastitis Test” (WMT), condutividade elétrica (CE), além da Contagem de Células Somáticas (CCS) (Langoni, 2000; Sinha et al., 2018).

O CMT foi desenvolvido por Schalm e Noorlander em 1957 sendo um método indireto de avaliação quantitativa de células somáticas do leite amplamente utilizado em propriedades rurais, devido à sua fácil execução, custo, rapidez e exatidão nos resultados (Ruegg, 2017). Utiliza-se amostras de leite de cada quarto mamário em uma raquete plástica própria com quatro compartimentos independentes. O teste baseia-se na atuação do reagente lauril sulfato de sódio a 3%, um detergente aniônico corado com púrpura de bromocresol que age sobre a membrana das células somáticas, causando a ruptura das mesmas e a formação de um gel na interação dos ácidos nucléicos com o detergente. A avaliação dos resultados é feita por meio da visualização da intensidade e viscosidade desenvolvida pelas amostras. Desta forma, quanto maior o grau dessa viscosidade maior será o número de células somáticas presente na amostra (Langoni, 2000).

O CMT pode apresentar resultados falso-positivos ou falso-negativos oriundos de falhas durante o procedimento do teste. No intuito de eliminar a subjetividade criada por tais falhas foi criado o WMT, que utiliza o mesmo princípio, porém é realizado com o auxílio de um viscosímetro (Ruegg, 2017).

As células somáticas no leite são provenientes da descamação do epitélio secretor mamário. Vários fatores podem influenciar a variação da CCS, sendo fatores intrínsecos ao animal como a profundidade do úbere, período de lactação; fatores relativos ao equipamento de ordenha, manejo da ordenha, além do mês e estação do ano. Entretanto, a mastite é o principal fator responsável pela elevação da CCS (Lopes et al., 2018).

A CCS do leite pode ser feita com o leite do tanque, para indicar a situação

da saúde do rebanho, ou de vacas individualmente, para revelar as que mais contribuem para a elevação da CCS do rebanho e ainda também de quartos individuais para identificação de mastite. A CCS no leite pode ser realizada com o auxílio de equipamentos eletrônicos, automatizados, que permitem a realização de grande número de análises em pouco tempo que garantem precisão e acurácia dos resultados, ou pelo método microscópico que necessita de profissional treinado, além de ser mais oneroso e demorado (Arcanjo et al., 2017).

Atualmente a CCS é o parâmetro mais utilizado em programas de controle e prevenção da mastite em todo o mundo. No Brasil, a Instrução Normativa nº 76 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA estabelece que a CCS do tanque deve apresentar média geométrica trimestral de no máximo 500.000 células somáticas/mL (BRASIL, 2018).

A CE mede a capacidade que uma solução tem em conduzir uma corrente elétrica entre dois eletrodos, mensurada em miliSiemens (mS). Os ânions (Cl⁻) e cátions (Na⁺, e K⁺) são os mais relevantes para a determinação, tais íons são transportados na glândula mamária a partir do sangue em condições fisiológicas. Quando o animal apresenta mastite, ocorre aumento das concentrações de Na⁺ e Cl⁻ no leite, elevando a CE (Norberg, 2004).

As medições da CE no leite têm sido utilizadas como uma importante ferramenta para identificar animais que apresentam mastite subclínica ou início de mastite clínica. Para aferir a CE pode-se utilizar equipamentos portáteis ou medidores que podem ser acoplados a ordenhadeira mecânica ou estar presente em equipamentos robóticos de ordenha utilizar equipamentos, permitindo a identificação precoce e o monitoramento diário de casos de mastite no rebanho, na propriedade (Norberg, 2004; Maculan e Lopes, 2016).

O princípio da termografia infravermelha é que todos os corpos emitem radiação infravermelha, contudo a intensidade dessa radiação depende da temperatura do objeto e da capacidade que esse tem em emitir tal radiação. A luz infravermelha é um tipo de energia emitida pelos corpos e invisível ao olho humano. A termografia infravermelha consiste no mapeamento térmico da superfície de um corpo, captando as variações de temperatura emitida por estes através da radiação infravermelha (Alves; Vecchia, 2012). Sinha et al. (2018) informam que os métodos auxiliares de diagnóstico de mastite subclínica que conferem respostas imediatas e precisas no próprio local de ordenha, como a termografia infravermelha, são

fundamentais aos produtores e responsáveis pela assistência técnica nas propriedades rurais.

1.2.6 Aprendizado de máquina

O estudo de técnicas que considerem a relação e o comportamento das diferentes variáveis que podem influenciar no diagnóstico da mastite subclínica podem otimizar os resultados e levar à identificação de padrões, facilitando e acelerando o diagnóstico e a tomada de decisões, pelos produtores e técnicos (Jabour et al., 2022).

O aprendizado de máquina consiste na capacidade do sistema em adquirir habilidades de maneira autônoma ao extrair padrões de grandes bancos de dados, oriundos de diversas fontes de coleta e conhecidos como “*Big Data*”. Na área da saúde, a quantidade de dados criados pode contribuir ainda mais com a acurácia de ferramentas que usam o aprendizado de máquina (Topol, 2019).

A escolha do melhor ajuste de um modelo estatístico de aprendizado de máquina é realizada por meio da estimação de parâmetros para todas as possíveis estruturas e a comparação de índices de desempenho. As técnicas de aprendizagem de máquina procuram o equilíbrio entre o bom ajuste e o número de parâmetros. De uma forma geral, o modelo mais simples apresenta melhor desempenho para a estimação de novos dados (Faraco et al., 2008).

As técnicas de aprendizado de máquina têm sido utilizadas com maior frequência nos últimos anos, inclusive para o diagnóstico da mastite subclínica bovina (Zaninelli et al., 2019; Watz et al., 2019). A utilização destas técnicas favorece a automatização do processo de monitoramento da mastite através de modelos preditivos.

REFERÊNCIAS

Adkins PRF, Middleton JR. (2018) Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 34: 479-491.

Alves EDL, Vecchia FAS. (2012) Influência de diferentes superfícies na temperatura e no fluxo de energia: um ensaio experimental/Influence of different surfaces on the temperature and energy flux. **Revista Ambiência** 8: 10-111.

Angeletti S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, 138: 20–29.

Anhlati JP, Fenselau C. (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry** 47: 219-225.

Arcanjo MHA, Oliveira SCP, Moreria CL, Jayme GC, Soares, NA, Oliveira RA, Pereira AK, Nogueira RAM. (2017) Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology** 10: 5:10.

Ashraf A, Imran M, Yaqub, T, Tayyab M, Shehzad W, Thomson PC. (2017) A novel multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogens associated with bovine mastitis. **Molecular and cellular probes** 33: 57–64.

Bach A. Cabrera V. (2017) Robotic milking: Feeding strategies and economic returns. **Journal of Dairy Science** 100: 7720-7728.

Barcelos MM, Martins L, Grenfell RC, Juliano L, Anderson KL, Santos MV, Gonçalves JL. (2019) Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology** 50: 3309-3104.

Bianchi RM, Schwertz CI, de Cecco, BS, Panziera W, De Lorenzo C, Heck LC, Snel GGM, Lopes BC, Silva FS, Pavarini SP, Driemeier, D. (2019). Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. **Tropical Animal Health and Production** 51: 2057-2066.

BRASIL. (2018) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº76 de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**. Ed. 230, Seção 1, Página 9. 2018.

Britten AM. (2012) The Role of Diagnostic Microbiology in Mastitis Control Program. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 20:187-202.

Cantú MD, Carrilho E, Wulff, NA, Palma MS. (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova** 31: 669-675.

Cardoso RB, Pedreira MS, Rech CLS, Silva HGO, Rech JL, Schio AR, Aguiar LV, Silva AS, Silva, HA. (2017) Produção e composição química do leite de vacas em lactação mantidas a pasto submetidas à diferentes sistemas alimentares. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**.18: 113-127.

Cattaneo MAG, Cavalchini GL, Rogonoi GL. (1996) Design and construction of a robotic milking system. **Sixth International Conference on Computers in Agriculture**. Cancun, México.

De Koning K. (2011) Automatic milking: Common practice on over 10,000 dairy farms worldwide. **Proceedings of the Dairy Research Foundation Symposium**, Sydney, Canadá.

Faraco MA, Uribe-Opazo A, Silva EAAD, Johann JA. (2008). Seleção de modelos de variabilidade espacial para elaboração de mapas temáticos de atributos físicos do solo e produtividade da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 32: 463-476.

Ferland J, Vasseur E, Duplessis M, Pajor EA, Pellerin D. (2016) Economic impact of introducing automatic milking system on Canadian dairy farms. **Journal of Animal Science** 94: 600.

Fox EM, Jiang Y, Gobius KS. (2018) Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. **International Dairy Journal** 84: 165-172.

Gargiulo JI, Eastwood CR, Garcia SC, Lyons NA. (2018) Dairy farmers with larger herd sizes adopt more precision dairy technologies. **Journal of Dairy Science**. 101: 5466-5473.

Holland RD, Wilikis JG, Rafii F, Sutherland JB, Person CC, Voorhees KJ, Lay Jr JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 10: 1227-1237.

Horneffer V, Forsmann A, Strupat K, Hilenkamp F, Kubitscheck U. (2001) Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 73: 1016-1022.

Hovinen M, Pyorala S. (2011) Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. **Journal of Dairy Science**, v. 94: 547-562.

Hyde RK, Down PM, Bradley AJ, Breen JE, Hudson C, Leach KA, Green MJ. (2020) Automated prediction of mastitis infection patterns in dairy herds using machine learning. **Scientific Reports – Nature** 10:1-8.

Jabour FG, Figueiredo RMO, Mourão-Junior CA. (2022). Aprendizado de Máquinas aplicado ao diagnóstico por imagem: uma revisão integrativa. **Conjecturas**. 22: 265-284.

Jacobs JA, Siegford JM. (2012) Invited review: The impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 95: 2227-2247.

Kim H, Min Y, Choi B. (2019) Real-time temperature monitoring for the early detection of mastitis in dairy cattle: methods and case researches. **Computer Electronic Agriculture** 162: 119-125.

Lange MJM, Zambom A, Pozza MS, Simões T, Fernandes RC, Tinini FA, Anschau FA. (2017) Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37: 1205-1212.

Langoni H. (2000) Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação Continuada do CRMV- SP** 3: 57-64.

Lima RS, Danielski GC, Pires ACS. (2018). Mastitis Detection and Prediction of Milk Composition Using Gas Sensor and Electrical Conductivity. **Food and Bioprocess Technology**. 11: 551–560.

Lopes BCM, Pinho M, Langoni H. (2018). Etiologia das mastites: pesquisa de microorganismos da classe Mollicutes. **Veterinária e Zootecnia** 25: 173-179.

Maculan R, Lopes MA. (2016) Ordenha robotizada de vacas leiteiras: uma revisão. **Boletim de Indústria Animal** 73: 80-87.

Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, Braughton KR, Scott DP, Gardner DJ, Deleo FR. (2016) Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. **PloS one** 11: 87-96.

Martins JD, Nicolau ES, Mesquita AJ, Jardim EAGV. (2015) Subclinical mastitis in dairy cattle rural properties Goiás. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 9: 191.

Nonnemann B, Lyhs U, Svennesen L, Kristensen KA, Klass IC, Pedersen K. (2019) Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science** 102: 2215-2224.

Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KHMN, Løvendahl P. (2004) Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. **Journal Dairy Science** 87: 1099- 1100.

Ohnstad I, Riekerink RO, Hogewerf P, De Koning CAJM, Barkema HW. (2012) Effect of automatic postmilking teat disinfection and cluster flushing on the milking work routine. **Journal of Dairy Science** 95; 2567-2570.

Oliveira D, Borges A, Simões M. (2018) Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins** 10: 252.

Posteraro B, Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. (2013) Maldi-Tof mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: Identification of fungi and beyond. **Expert Review of Proteomics** 10: 151-164.

Ruegg, PLA. (2017). 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. 100: 10381–10397.

Salfer JA, Minegishi K, Lazarus W, Berning W, Endres MI. (2017) Finances and returns for robotic dairies. **Journal of Dairy Science**. 100: 7739-7749.

Salina A, Timenetsky J, Barbosa, MS, Azevedo CM, Langoni H. (2020) Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 40: 82–87.

Santos MV, Fonseca LFL. (2019) **Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. Pirassununga: Edição dos Autores, 301 p.

Sathiyabarathi M, Jeyakumar S, Manimaran A, Jayaprakash G, Pushpadass HA, Sivaram M, Ramesha KP, Das DN.; Kataktalware MA, Prakash, MA, Kumar RD. (2016) Infrared thermography: a potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. **Veterinary World** 9: 1075-1081.

Singhal N, Kumar M, Kanujia PW, Viridi JS. (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology** 6: 791.

Sinha R, Bhakat M, Mohanty TK, Ranjan A, Kumar R, Lone AS, Rahim A, Paray AR, Khosla K, Danish Z. (2018) Infrared thermography as noninvasive technique for early detection of mastitis in dairy animals - A review. **Asian Journal of Dairy and Food Research** 37: 1-6.

Svennesen L, Mahmoud Y, Pedersen K, Kromker V. (2018) Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae in milk and teat skin from cows in automatic milking systems. **National Mastitis Council**, Tucson, Estados Unidos.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo, (1988) T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2: 151-153.

Tse C, Barkema HW, Devries TJ, Rushen J, Pajor EA. (2017) Effect of transitioning to automatic milking systems on producers' perceptions of farm management and cow health in the Canadian dairy industry. **Journal of Dairy Science** 100: 2404-2414.

Topol EJ. (2019). High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. **Nature Medicine**. 25: 44-56.

Wattal C, Oberoi K, Goel N, Raveendran R, Khanna S. (2017) Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 36: 807-812.

Watz S, Petzl W, Zerbe H, Riegger A, Glass W, Schröter W, Landgraf T, Metzner M. (2019). Technical note: Automatic evaluation of infrared thermal images by computerized active shape modeling of bovine udders challenged with *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**. 102(5): 4541–4545.

Zaninelli M, Redaelli V, Luzi F, Bronzo V, Mitchell M, Dell'orto V, Bontempo V, Cattaneo D, Savoini G. (2018) First evaluation of infrared thermography as a tool for the monitoring of udder health status in farms of dairy cows. **Sensors** 18: 862.

Capítulo 2 – Use of infrared thermography for predicting the infectious etiology of subclinical bovine mastitis in a robotic milking system using machine learning

USE OF INFRARED THERMOGRAPHY FOR PREDICTING THE INFECTIOUS ETIOLOGY OF SUBCLINICAL BOVINE MASTITIS IN A ROBOTIC MILKING SYSTEM USING MACHINE LEARNING¹

Fernando David Caracuschanski^{*}; Raul Costa Mascarenhas Santana[‡]; Larissa Cristina Brassolatti^{*}; Maria Laura da Silva[§]; Christine Elisabeth Grudzinski[†]; Marcos Veiga dos Santos[#]; Teresa Cristina Alves[¶]; Alexandre Rossetto Garcia[¶]; Simone Cristina Méo Niciura[¶]; Luiz Francisco Zafalon[¶].

^{*}Masters Student in the Graduate Program in Veterinary Sciences at the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences of the São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Postal Code: 14884-900.

[‡]Doctoral Student in the Graduate Program in Veterinary Science at the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences of the São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Postal Code: 14884-900.

[§]Undergraduate Research Student at the Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Southeastern Livestock. São Carlos, São Paulo. Brazil. Postal Code: 13560-970.

[†]Masters Student in the Graduate Program in Animal Reproduction at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo. Pirassununga, São Paulo, Brazil. Postal Code: 13635-900.

[#]Full Professor in the Department of Nutrition and Animal Production at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo. Pirassununga, São Paulo, Brazil. Postal Code: 13635-900.

[¶]Researcher at the Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Southeastern Livestock. São Carlos, São Paulo, Brazil. Postal Code: 13560-970, P.O. Box 339.

¹The present study was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Funding Code: 88887.650546/2021-00, the São Paulo Research Foundation – Brazil (FAPESP) – Process Fapesp No. 2020/16240-4, and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – Process No. 404513/2021-2.

ABSTRACT: Mastitis poses a major challenge for dairy producers and industries, infrared thermography is a potential method for identifying cows with the disease; however, its reliability is influenced by a variety of factors, including animal and environmental conditions. The application of machine learning techniques can enhance thermal diagnosis. Thus, the objective of this study was to assess the use of infrared thermography for predicting the infectious etiology of subclinical bovine

mastitis using machine learning techniques in a voluntary milking system for pasture-raised cows. Eighty-nine lactating cows from a rural property in São Carlos, SP, Brazil underwent thermographic analyses of their mammary glands over six months. Values (°C) corresponding to the mean (MED), minimum (COLD), and maximum (HOT) temperatures of the udders were recorded. Microbiological examinations, evaluation of fat levels, and somatic cell counts (SCCs) in milk samples were also conducted. Data, such as lactation stage, breed, parity, collection date, time of milking, and the mammary quarter cleanliness index, ambient temperature and relative air humidity were obtained. Supervised machine learning techniques were used to predict mastitis and its infectious etiology using infrared thermography. Logistic regression models were utilized and compared. The evaluation of udder thermal parameters indicated a moderate positive correlation between body temperature and MED. The area under the ROC curve (AUC) for the prediction of subclinical bovine mastitis using infrared thermography was 0.96. The multinomial logistic regression technique showed high sensitivity (>0.95) in the identification of *S. aureus*, *S. uberis*, and *S. dysgalactiae* species. The AUC ROC for predicting the infectious etiology of subclinical bovine mastitis using infrared thermography was 0.90. The SCC was significant in predicting mastitis and *S. aureus*, *S. uberis*, and *S. dysgalactiae* species, unlike fat levels, which were not significant in any of the logistic models analyzed. The Holstein breed was significant in the multinomial logistic method. Infrared thermography showed potential for the prediction of subclinical bovine mastitis caused by *S. aureus*, *S. uberis*, and *S. dysgalactiae* in a management style not commonly associated with robotic milking, specifically, extensive cow rearing. The use of combined machine learning logistic models can optimize the identification of pathogens causing mastitis in bovine herds.

Keywords: Milk; Diagnosis; Somatic Cell Count; MALDI-TOF; Animal Health.

INTRODUCTION

Mastitis is one of the most significant diseases in veterinary medicine, with a prevalence of approximately 46% in dairy herds (Busanello et al., 2017). The leading causes of mastitis are bacterial, stemming from the imbalance in the interaction of the epidemiological triad composed of the animal, the microbial agent, and the environment (Martins et al., 2015; Santos; Fonseca, 2019). The entry of microorganisms into the mammary gland occurs through the teat orifice and canal, until reaching the alveoli, resulting in an inflammatory response that includes an increase in udder temperature before the initial clinical signs. The thermal amplitude

of the mammary gland during the inflammatory response varies depending on the type of etiological agent (Pezeshki et al., 2011).

The disease can be classified based on the clinical manifestations in the udder and the animal, as well as the route of transmission of the etiological agent. In clinical mastitis, the cow shows visual signs of inflammation. On the other hand, the subclinical form lacks visible changes in the milk and/or mammary gland, but there are alterations in composition and somatic cell count, resulting in losses associated with reduced milk production and quality (Lopes et al., 2018).

Environmental mastitis is caused by opportunistic microorganisms that can be transmitted between milking sessions, especially in environments with poor hygiene. The pathogens most commonly associated with environmental mastitis include *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Streptococcus uberis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Contagious mastitis, in turn, is associated with transmission during milking due to inadequate hygiene practices during the milking process, and is considered the most common form in subclinical cases. The microorganisms related to contagious mastitis include *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Corynebacterium bovis* (Lopes et al., 2018).

The decline in profitability and the increase in labor costs have prompted dairy producers to seek ways to make the production system more profitable. New technologies are being used for milk production, including robotic milking (Bach; Cabrera, 2017). Robotic milking systems are standardized based on the morphological characteristics of cows, and there is no monitoring of the cleaning effectiveness (Melo et al., 2012), especially in pasture-raised cows. According to Jacobs and Siegford (2012) and Melo et al. (2012), these systems face greater

challenges in preparing dirty teats during pre-milking, posing a risk for new intramammary infections.

Common diagnostic tests for subclinical mastitis include the “California Mastitis Test” (CMT), the “Wisconsin Mastitis Test” (WMT), the Hydrogen Ion Potential (pH), and Electrical Conductivity (EC), as well as the Somatic Cell Count (SCC) (Langoni, 2000; Busanello et al., 2017). In addition to these conventional tests, infrared thermography of the udder can also be used as a diagnostic method for subclinical mastitis, with the advantages of being non-invasive and quickly applicable at the milking site (Sinha et al., 2018).

The infrared radiation emitted by a body (animal) can be affected by environmental conditions, such as sunlight incidence, weather conditions, humidity, and potential dirtiness (Sathiyabarathi et al., 2016; Sinha et al., 2018). Therefore, the development of models considering the relationship between different variables that can influence the diagnosis of subclinical mastitis can enhance results and lead to the identification of diagnostic patterns, facilitating and expediting decision-making (Jabour et al., 2022).

Machine learning techniques are associated with a system’s ability to autonomously acquire skills by extracting patterns from large databases. In the field of healthcare, the substantial amount of generated data can further contribute to the accuracy of tools that utilize machine learning (Topol, 2019). Thus, the early detection of subclinical mastitis and the etiological agent can assist in making specific management decisions regarding the control of environmental or contagious factors of mastitis (Hyde et al., 2020).

The use of machine learning techniques facilitates the automation of the mastitis monitoring process through predictive models. In tropical climate countries,

the management of lactating cows is less intensive than in temperate climate countries. Conversely, information on the diagnosis and control of mastitis in cows submitted to robotic milking remains scarce. Thus, the aim of this study was to evaluate infrared thermography for predicting the infectious etiology of subclinical bovine mastitis using machine learning in a voluntary milking system for pasture-raised cows.

MATERIALS AND METHODS

Bioethics

The milk production procedures, housing, maintenance, and use of lactating cows were carried out in accordance with the regulations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and the experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Use of Embrapa Southeastern Livestock (CEUA/PPPSE Protocol No. 04/2021).

Herd characteristics

This study was conducted at the experimental field of Embrapa Southeastern Livestock, in São Carlos, SP, Brazil (21°57'59"N, 47°51'17"W; 856 m AMSL), with an average annual temperature ranging between 16.3°C and 23°C and an annual rainfall of 1,502 mm. The herd consisted of 89 Holstein cows and their crossbreeding with Jersey cows, and had an average daily milk production of 25.3 kg/milk/day. The animals were reared in rotating pastures of *Panicum* spp. and *Urochloa* spp., and were provided with concentrate according to their production levels, along with a mineral mix and water *ad libitum*; during the winter, they were also supplemented with corn silage.

Robotic milking

The cows were voluntarily milked in an automatic system (DeLaval VMS V300, Tumba, Sweden) equipped with a robotic arm, an optical camera, and a laser for teat identification. Pre- and post-milking hygiene procedures, involving the use of iodine-based disinfectant, followed by backflushing and air drying, were performed individually, with the automatic attachment and removal of teat dip cups.

Information regarding the date and time of milking, the cleanliness indices of the mammary quarters (classified according to Cardozo et al., 2015), parity, and lactation stage were collected. The milk samples and other measurements were obtained before each milking session during the daytime period (8:00 AM – 05:00 PM) over three summer months (December/2021 to February/2022) and three winter months (June/2022 to August/2022).

Immediately after milking, the internal body temperature of the animals was evaluated transrectally using a veterinary clinical digital thermometer (Digital TH186, Incoterm, Porto Alegre, Brazil; measuring range 32.0–44.0°C, resolution 0.01°C, max error $\pm 0.1^\circ\text{C}$, self-checking system).

Additionally, the temperature-humidity index (THI-T/THI-B) was calculated using the equations proposed by Thom et al. (1959) and Buffington et al. (1981) based on readings, taken at five-minute intervals, of ambient temperature, dew point temperature, and relative air humidity (Costa et al., 2015) by HOBO U12-013 data loggers installed on the milking robot.

Thermographic analyses of the udder

The surface temperatures of the mammary quarters were assessed using infrared thermography. Thermographic images were captured with a portable thermal camera, featuring a 640 x 480-pixel detector, equipped with a fixed 25° lens, an 11° x 9° telephoto lens, thermal sensitivity of < 40 mK (<0.04°C at an ambient temperature of 30°C), and temperature scale ranging from -30 to 350°C, using the manual focus option (Testo AG; Lenzkirch, Germany).

Thermograms of the surface temperatures of the mammary glands from the lateral position of the anterior and posterior quarters of the right udder half of each cow were generated. Following the recommendation of Yang et al. (2018), the images were obtained before any manipulation of the udder and teats, prior to milk sample collection for microbiological examination, and before milking. The thermograms were analyzed in the laboratory using IRSoft software, version 4.5 (Testo AG; Lenzkirch, Germany). The mean surface temperature (°C) of the gland (MED) was determined by calculating the mean number of pixels within the defined region of interest, while the minimum (COLD) and maximum (HOT) surface temperatures were determined by the automatic identification of points with the lowest and highest temperatures, respectively.

Microbiological analyses for the diagnosis of mastitis

The milk samples were individually collected from each mammary quarter in sterilized test tubes and promptly sent to the laboratory on the same day. Prior to collection, the first three streams of milk were discarded, and the teat extremities were sanitized with cotton soaked in a 70% (v/v) ethyl alcohol solution, following the recommendations of the National Mastitis Council (Oliver et al., 2004). In the laboratory, 0.01 mL aliquots of each sample were streaked on quadrants of Petri

dishes containing agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood. Subsequently, they were incubated aerobically at 37°C and read at 24-hour intervals for up to 72 hours.

Colonies were macroscopically observed based on morphotintorial, biochemical, and cultivation characteristics (Koneman et al., 2001). The presence of microorganisms in the mammary quarter was considered positive when one or more colonies with the same morphology, pigmentation, and type of hemolysis were identified (Costa et al., 2019). All microbial isolates underwent the MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) technique for microbial identification (Barcelos et al., 2019).

Somatic cell count and determination of milk fat content

The somatic cell count (SCC) and milk fat levels for the samples collected from each mammary quarter were determined at the reference laboratory for Milk Quality, accredited in the Brazilian Network of Milk Quality Analysis Laboratories (*Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite – RBQL*), using the electronic equipment CombiFoss 7 (FOSS/Denmark).

Statistical analyses and machine learning techniques

All analyses were conducted using the R program, version 4.2.3 (R Core Team 2023). Supervised machine learning techniques were adopted using two logistic regression models: a multilevel binary logistic model to predict the presence or absence of infection and a multinomial logistic model to predict the infectious etiology of mastitis. In this context, the microbiological diagnosis of the milk samples served as the response variable, while animal, breed (Holstein - H1, 5/8 Holstein -

HC, 1/2 - Holstein - HJ, Jersolanda - HK, 3/4 Holstein - HT, and 1/4 Holstein - HU), season (winter or summer), udder (anterior or posterior), SCC, production, fat content, dirtiness (1 to 4), parity (1 to 7), lactation stage, body temperature, COLD, HOT, MED, THI-T, and THI-B were used as explanatory variables. In the analyses, categorical explanatory variables were binarized using the “dummy_columns” function of the “fastDummies” package (Kaplan, 2020). Pearson’s correlation between quantitative variables was calculated using the “chart.Correlation” function of the “PerformanceAnalytics” package. For normalization, the SCC data were subjected to logarithmic transformation (SCClog).

For the multilevel binary logistic model, the “glmer” function of the “lme4” package was used (Bates et al., 2015); the response variable was classified as 0 (absence of microorganisms) and 1 (presence of microorganisms). The variables of interest were included as fixed effects, and the animal was considered a random effect. In order to construct the ROC curve, the “roc” function of the “pROC” package was used, and the “confusionMatrix” function of the “caret” package was used to build the confusion matrix with different cutoff points to determine the accuracy, sensitivity, and specificity of the predictive model (Kuhn, 2008; Robin et al., 2011).

In the multinomial logistic regression model, the response variable considered the five most common categories (Negative; *Staphylococcus aureus*; Coagulase-negative *Staphylococcus*; *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis*), and the explanatory variables were included as fixed effects in the GLM model using the “multinom” function of the “nnet” package. The random effect was not found to be significant and, therefore, was not included in the multinomial model. Subsequently, the “multiclass.roc” function of the “pROC” package was used to construct the

multinomial ROC curve and determine the area under the ROC curve (AUC), sensitivity, and specificity (Venables; Ripley, 2002; Wei; Wang, 2018).

The risk ratio (odds ratio), confidence interval (CI), and significance of the variables (p-value) from the multilevel binomial and multinomial logistic regression models were obtained using the “sjPlot” package (Lüdecke, 2023). Model fits were assessed and compared using the Akaike Information Criterion (AIC) and the Bayesian Information Criterion (BIC), and the ROC curves were compared using the “roc.test” function, which applies the DeLong test, with a significance level of 5% (Dellaportas et al., 2002; Faraco et al., 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

During the study, milk samples from 530 mammary quarters were analyzed, revealing a frequency of subclinical mastitis of 11.5%. Descriptive statistics were obtained for the quantitative explanatory variables (Table 1), as well as Pearson’s correlation (Table 2).

Table 1. Descriptive statistics of the quantitative variables used for predicting subclinical bovine mastitis in robotic milking of a pasture-raised cattle herd.

Variable	Minimum	Mean	Maximum	Standard Deviation	Standard Error
SCC¹	3,000	379,600	9,999,000	1,270,423	55,183
Production²	0.22	3.17	8.70	1.29	0.06
Fat Content³	0.20	1.56	10.88	1.06	0.05
Parity⁴	1.00	3.07	7.00	1.92	0.80
Lactation St.⁵	5.00	149.40	416.00	88.61	3.85
Temp⁶	36.37	38.26	41.26	0.72	0.03
COLD⁷	23.40	31.55	38.10	2.90	0.13

HOT⁸	25.10	36.59	40.50	2.82	0.12
MED⁹	24.30	34.78	39.40	2.78	0.12
THI-B¹⁰	44.36	126.12	166.79	21.45	0.93
THI-T¹¹	58.02	72.35	80.28	4.55	0.20

¹Somatic cell count in cells/mL; ²milk production in liters per mammary quarter; ³milk fat content in g/100L; ⁴number of calvings; ⁵lactation stage in days; ⁶internal body temperature in °C; ⁷minimum udder temperature in °C; ⁸maximum udder temperature in °C; ⁹mean udder surface temperature in °C; ¹⁰temperature-humidity index according to the equation described by Thom et al.; ¹¹temperature-humidity index according to the equation described by Buffington et al.

The SCC of the milk from the mammary quarters exhibited significant variation, ranging from 3,000 to 9,999,000, reflecting samples from quarters both with and without subclinical mastitis. Furthermore, the distribution was asymmetric, concentrating to the left, indicating lower count values. Consequently, the SCC data were analyzed following logarithmic transformation (SCClog).

Table 2. Pearson's correlation of the quantitative variables used for predicting subclinical bovine mastitis in robotic milking of a pasture-raised herd.

	SCC	Prod	Fat	Pari	St	Temp	COLD	HOT	MED	THI-B	THI-T
SCC¹	-	-0.1	<0.1	0.11	0.11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Prod²	-0.1	-	-0.5	0.14	-0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Fat³	<0.1	-0.5	-	<0.1	0.14	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-0.1	-0.1
Pari⁴	0.11	0.14	<0.1	-	0.21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

St⁵	0.11	-0.2	0.14	0.21	-	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Temp⁶	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	0.47	0.47	0.53	0.49	0.63
COLD⁷	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.47	-	0.66	0.76	0.37	0.52
HOT⁸	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.47	0.66	-	0.97	0.46	0.58
MED⁹	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.53	0.76	0.97	-	0.51	0.65
THI-B¹⁰	<0.1	<0.1	- 0.12	<0.1	<0.1	0.49	0.37	0.46	0.51	-	0.89
THI-T¹¹	<0.1	<0.1	- 0.11	<0.1	<0.1	0.63	0.52	0.58	0.65	0.89	-

¹Somatic cell count; ²milk production; ³milk fat content; ⁴number of calvings; ⁵lactation stage; ⁶internal body temperature; ⁷minimum udder temperature; ⁸maximum udder temperature; ⁹mean udder surface temperature; ¹⁰temperature-humidity index according to the equation described by Thom et al.; ¹¹temperature-humidity index according to the equation described by Buffington et al.

The milk fat content showed a moderate negative correlation (-0.50) with milk production (Table 2), which can be attributed to the dilution effect of fat related to the higher quantity of milk produced (Olives et al., 2020). Mukaka (2012) reported a moderate positive correlation (0.53) between body temperature and the mean temperature of the mammary gland, but a weak positive correlation (0.47) between body temperature and the maximum and minimum temperatures of the udder.

The thermographic measurements of the udder (COLD, HOT, and MED) showed a weak correlation (< 0.1) with the SCC. In contrast, Machado et al. (2021)

assessed udder surface temperature using infrared thermography by considering the temperature of the central area, the left and right sides, and the mean of these three values, and found a strong correlation (0.88) between udder temperature and milk SCC in animals managed in a compost barn system.

The THI-B and THI-T showed a moderate positive correlation (0.51/0.65) with the MED. THI-B and THI-T serve as indicators of thermal stress, and based on Armstrong's classification (1994), the thermal stress categories are defined as follows: < 71 as the thermal comfort zone, 72-79 as mild stress, 80-90 as moderate stress, and > 90 as severe stress. Thus, the mean values of THI-B (126.12) and THI-T (72.35) obtained in this study indicated severe and mild thermal stress in the animals, respectively. Daltro et al. (2017) highlighted that thermal stress induces vasodilation in peripheral areas to facilitate heat exchange, resulting in increased blood flow and udder surface temperature. Therefore, in properties where animals are exposed to thermal stress conditions, it is advisable to perform thermograms during the cooler parts of the day.

The frequencies of isolation of the infectious agents in the milk obtained from the mammary quarters are detailed in Table 3.

Table 3. Frequencies of microorganisms isolated in milk from mammary quarters with subclinical mastitis in a herd with robotic milking.

Microorganism	Absolute Frequency	Relative Frequency (%)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	28	36.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	13.0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	10	13.0
<i>Streptococcus uberis</i>	6	7.8

<i>Lactococcus lactis</i>	5	6.5
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	2.6
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2.6
<i>Staphylococcus hyicus</i>	2	2.6
<i>Streptococcus</i> spp.*	2	2.6
<i>Streptococcus pnaeicida</i>	1	1.3
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	1.3
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	1.3
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1.3
<i>Staphylococcus</i> spp.*	1	1.3
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1.3
<i>Nocardia farcinia</i>	1	1.3
Yeast**	1	1.3
<i>Rothia endophytica</i>	1	1.3
Total	77	100

*Species not identified. **Genus not identified.

The most prevalent microorganism (36.3%) was *S. chromogenes*. Israel et al. (2018), when analyzing milk samples from cases of subclinical bovine mastitis on ten dairy farms in the state of Acre, northern Brazil, identified a prevalence of 43.4% for *S. chromogenes*, a higher occurrence than in the present study. Although some authors have reported strains of *S. chromogenes* with the potential to coagulate blood plasma (Santos et al., 2016; Israel et al., 2018), Santos and Fonseca (2019) stated that *S. chromogenes* belongs to the coagulase-negative *Staphylococcus*

(CNS) group, classified as emerging microorganisms with several virulence factors, such as biofilm production and low susceptibility to antimicrobials, commonly found in cases of subclinical mastitis. These microorganisms are associated with flaws in the cleaning of milking equipment (Israel et al., 2018).

Jacobs and Siegford (2012) cautioned that, in robotic milking, the system is unable to monitor the effectiveness of teat cleaning, in addition to having lower teat cleaning efficiency. As a consequence, the inefficiency of mastitis prevention processes in robotic milking may favor a higher occurrence of *S. chromogenes* compared to other CNS species, as this species is not common to humans and is often associated with cases of mastitis in herds (Melo et al., 2012).

The second most prevalent microorganism (13.0%) was *S. aureus*. Pinto et al. (2021) observed a higher prevalence (18%) of *S. aureus* using biochemical tests for the identification of the infectious etiology of mastitis. However, biochemical tests have a higher risk of erroneously identifying microorganisms with similar metabolisms when compared to more accurate techniques, such as PCR and MALDI-TOF (Nonnemann et al., 2019).

S. aureus is often associated with virulence factors such as biofilm formation, enterotoxin production, and antimicrobial resistance, all of which have negative implications for both animal and human health (Lavor et al., 2019). The methods for controlling mastitis caused by *S. aureus* are limited in lactating cows. Santos and Fonseca (2019) suggest separating infected animals from healthy ones, recommending the milking line technique, which involves milking healthy primiparous cows first, followed by multiparous cows with no history of mastitis, then by cured cows with a history of mastitis, cows with subclinical mastitis, and, lastly, cows with clinical mastitis. However, in robotic milking, the use of the milking line is not feasible

since milking is voluntary, thus hindering the application of this effective technique for controlling *S. aureus*. The occurrence of *S. aureus* may be related to deficiencies in the cleaning of the robotic milking system, as this microorganism is transmitted from one animal to another through direct or indirect contact with utensils and equipment. Therefore, transmission among herd animals primarily occurs during milking through contact between the animal's teat and contaminated surfaces (Israel et al., 2022). Moreover, microorganisms can persist in the environment for extended periods of time.

The prevalence of microorganisms from the *Streptococcus* genus (*S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Streptococcus* spp., and *S. panaeicida*) was 24.7%. Environmental streptococci are primary mastitis-causing microorganisms, and their involvement in the etiology of this disease may result from flaws in environmental hygiene management. These microorganisms possess opportunistic characteristics and give rise to high-intensity inflammatory responses and an increase in SCCs (Santos; Fonseca, 2019; Kirkeby, 2020). Capellari et al. (2022) assessed the etiological profile of bovine mastitis in 15 dairy herds in the Chapecó region, SC, Brazil, and observed a prevalence of 17.8% for non-*agalactiae* streptococci, a similar rate to that found in the present study (22.1%).

The multilevel binomial logistic regression model identified SCClog and COLD as significant variables ($p > 0.05$) for predicting subclinical mastitis, with the animal variable considered a random effect.

Based on this model, the probability of a given sample being infected could be calculated using the following equation:

$$P(\text{infected}) = \frac{1}{1 + e^{-(-7.65 + (0.76 * SCClog) + (-0.14 * COLD) + Animal)}}$$

$$\text{Animal} = N(0.2)$$

Where e = exponential; SCC_{log} = logarithm of somatic cell count; $COLD$ = temperature at the coldest point of the udder by infrared thermography; $Animal$ = random effect of the animal.

Different cutoff points were assigned for calculating the accuracy, sensitivity, and specificity values for predicting the occurrence of subclinical mastitis by the multilevel binary logistic model (Table 4 and Figure 1). The cutoff point of 0.16 resulted in a prediction with 90% accuracy, sensitivity, and specificity.

Table 4. Cutoff points, accuracy, sensitivity, and specificity for the ROC curve of the multilevel binomial logistic model for predicting subclinical bovine mastitis.

Cutoff points	Accuracy	Sensitivity	Specificity
0.10	0.86	0.95	0.85
0.11	0.87	0.93	0.86
0.12	0.87	0.93	0.87
0.13	0.89	0.93	0.88
0.14	0.89	0.90	0.88
0.15	0.89	0.90	0.89
0.16	0.90	0.90	0.90
0.17	0.90	0.88	0.91

Diagnostic sensitivity is related to the proportion of truly positive individuals, in this case, correctly classified animals with mastitis. Meanwhile, specificity refers to the proportion of true negatives, *i.e.*, correctly classified healthy cows. Diagnostic

accuracy determines the proportion of correctly predicted samples (Altman; Bland, 1994).

Statistical estimators are used in the analysis of diagnostic test performance, and one of the most commonly utilized is the ROC curve, which consists of a graphic representation of a model's performance based on its sensitivity and specificity rates (Hanley, 1989). In the multilevel binary logistic model, the area under the ROC curve (AUC) value was 0.96. The AUC provides an estimate of the probability of correct classification of a given random data, with general interpretations as follows: 0.5-0.6 (very poor), 0.6-0.7 (poor), 0.7-0.8 (fair), 0.8-0.9 (good), > 0.9 (excellent) (Hanley, 1989). In the present study, the AUC indicated the excellent performance of infrared thermography, specifically the measurement of COLD, in the prediction of subclinical bovine mastitis in a voluntary milking system with pasture-raised cows.

The odds ratio interprets the parameters of logistic regression models by comparing the probability of success to the probability of failure (Barros; Hirakata, 2003). The odds ratio values and confidence intervals (CI) for significant variables in the model (SCClog and COLD) are presented in Table 5. The calculation of the odds ratio revealed that an increase of one unit in the SCClog increases the odds of an animal having subclinical mastitis by 2.14-fold, while the odds of mastitis increase by 0.87 times for a one-unit increase in the COLD value.

Table 5. Odds Ratio, confidence interval (CI), and p-value for the variables in the multilevel binary model used to predict subclinical bovine mastitis in a robotic milking system.

Predictor	Odds Ratio	CI¹	p-value³
SCClog ²	2.14	1.68 – 2.73	<0.001

COLD ³	0.87	0.76 – 0.99	0.034
-------------------	------	-------------	-------

¹Confidence interval; ²logarithm of somatic cell count; ³minimum udder temperature by thermography.

The multinomial logistic model used the categories of microorganisms, based on the frequency of pathogens identified in the milk, as the response variable. The “CNS” category grouped coagulase-negative *Staphylococcus* species. The overall multinomial ROC curve showed an accuracy and AUC of 90%. The sensitivity, specificity, and AUC for each category are shown in Table 6.

Table 6. Area under the ROC curve, sensitivity, and specificity of the multinomial logistic regression model for the identification of healthy and infected mammary quarters by four categories of microorganisms through infrared thermography.

Categories	AUC ²	Sensitivity	Specificity
N ¹	0.84	0.54	0.80
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.97	0.96	0.51
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> (CNS)	0.77	0.75	0.52
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.98	0.97	0.51
<i>Streptococcus uberis</i>	0.99	0.99	0.51

¹Absence of microorganisms; ²area under the ROC curve.

The AUC values for predicting the categories of microorganisms “*S. aureus*”, “*S. dysgalactiae*”, and “*S. uberis*” were excellent, but the specificity was unsatisfactory (Table 6), increasing the chances of false positives. For the categories

“N” and “CNS”, the AUC values were lower (Table 6). The fact that CNS are classified in a category that includes more than one species of microorganisms may have influenced these results. Hyde et al. (2020) evaluated the transcriptome of microorganisms and applied machine learning techniques for diagnosing the infectious etiology of subclinical bovine mastitis. However, they observed that the sensitivity was low to moderate, while specificity was relatively high.

The infectious etiology of subclinical bovine mastitis predicted by the multinomial logistic model can be determined by calculating the highest probability value for each category using the following equations:

$$P(N) = \frac{1}{1 + e^{(-52.4+(1.7*SCClog)+(0.8*COLD)+(2.1*HOT)+(-2.8*MED)+(3.9*WinterSeason))} + e^{(1.0+(0.5*SCClog)+(-0.4*BodyTemp)+(1.0*WinterSeason))} + e^{(72.8+(-1.6*Production)+(-0.8*COLD)+(-1.9*THI-T)+(-3.0*WinterSeason))} + e^{(-278.9+(2.7*SCClog)+(2.6*Parity)+(0.04*LactSt)+(4.7*BodyTemp)+(5.9*HOT)+(-5.4*MED)+(-0.2*THI-B)+(-16.9*BreedH1))}}$$

$$P(S. aureus) = \frac{(-52.4 + (1.7 * SCClog) + (0.8 * COLD) + (2.1 * HOT) + (-2.8 * MED) + (3.9 * WinterSeason))}{1 + e^{(-52.4+(1.7*SCClog)+(0.8*COLD)+(2.1*HOT)+(-2.8*MED)+(3.9*WinterSeason))} + e^{(1.0+(0.5*SCClog)+(-0.4*BodyTemp)+(1.0*WinterSeason))} + e^{(72.8+(-1.6*Production)+(-0.8*COLD)+(-1.9*THI-T)+(-3.0*WinterSeason))} + e^{(-278.9+(2.7*SCClog)+(2.6*Parity)+(0.04*LactSt)+(4.7*BodyTemp)+(5.9*HOT)+(-5.4*MED)+(-0.2*THI-B)+(-16.9*BreedH1))}}$$

$$P(CNS) = \frac{(1.0 + (0.5 * SCClog) + (-0.4 * BodyTemp) + (1.0 * WinterSeason))}{1 + e^{(-52.4+(1.7*SCClog)+(0.8*COLD)+(2.1*HOT)+(-2.8*MED)+(3.9*WinterSeason))} + e^{(1.0+(0.5*SCClog)+(-0.4*BodyTemp)+(1.0*WinterSeason))} + e^{(72.8+(-1.6*Production)+(-0.8*COLD)+(-1.9*THI-T)+(-3.0*WinterSeason))} + e^{(-278.9+(2.7*SCClog)+(2.6*Parity)+(0.04*LactSt)+(4.7*BodyTemp)+(5.9*HOT)+(-5.4*MED)+(-0.2*THI-B)+(-16.9*BreedH1))}}$$

$$\begin{aligned}
& P(S. dysgalactiae) \\
&= \frac{(72.8 + (-1.6 * Production) + (-0.8 * COLD) + (-1.9 * THI - T) + (-3.0 * WinterSeason))}{1 + e^{(-52.4+(1.7*SCClog)+(0.8*COLD)+(2.1*HOT)+(-2.8*MED)+(3.9*WinterSeason))} + e^{(1.0+(0.5*SCClog)+(-0.4*BodyTemp)+(1.0*WinterSeason))} + e^{(72.8+(-1.6*Production)+(-0.8*COLD)+(-1.9*THI-T)+(-3.0*WinterSeason))} + e^{(-278.9+(2.7*SCClog)+(2.6*Parity)+(0.04*LactSt)+(4.7*BodyTemp)+(5.9*HOT)+(-5.4*MED)+(-0.2*THI-B)+(-16.9*BreedH1))}}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& P(S. uberis) \\
&= \frac{(-278.9 + (2.7 * SCClog) + (2.6 * Parity) + (0.04 * LactSt) + (4.7 * BodyTemp) + (5.9 * HOT) + (-5.4 * MED) + (-0.2 * THI - T) + (-16.9 * BreedH1))}{1 + e^{(-52.4+(1.7*SCClog)+(0.8*COLD)+(2.1*HOT)+(-2.8*MED)+(3.9*WinterSeason))} + e^{(1.0+(0.5*SCClog)+(-0.4*BodyTemp)+(1.0*WinterSeason))} + e^{(72.8+(-1.6*Production)+(-0.8*COLD)+(-1.9*THI-T)+(-3.0*WinterSeason))} + e^{(-278.9+(2.7*SCClog)+(2.6*Parity)+(0.04*LactSt)+(4.7*BodyTemp)+(5.9*HOT)+(-5.4*MED)+(-0.2*THI-B)+(-16.9*BreedH1))}}
\end{aligned}$$

Where SCClog = logarithm of somatic cell count; Production = milk production; Parity = number of calvings; LactSt = days in lactation; BodyTemp = body temperature of the animal; COLD = coldest point of the udder; HOT = hottest point of the udder; MED = mean number of pixels in the delimited area of the udder; THI-T = temperature and humidity index according to the equation described by Thom et al.; THI-B = temperature and humidity index according to the equation described by Buffington et al.; Breed H1 = Holstein breed; WinterSeason = collection months in the winter; e = Exponential.

In the prediction of the different categories of microorganisms, the somatic cell count proved to be significant ($p < 0.05$) in the multinomial logistic model, consistent with findings in other studies (Ebrahimi et al., 2019; Anglart et al., 2020; Bobbo et al., 2022). Ankinakatte et al. (2013) reported that using the SCC in machine learning models can enhance the prediction of subclinical mastitis by levels equal to or greater than 5%, likely because the cell count is one of the main variables altered in the inflammatory process of the udder.

The lactation stage and breed of the animals were found to be significant predictors for *S. uberis*. The fat content, which ranged from 0.2 g/100 mL to 10.9 g/100 mL, was not a significant parameter ($p>0.05$) in the models. Animals at different stages of lactation and of Holstein and Holstein x Jersey crossbreeds, which typically exhibit higher solid content (Felippe et al., 2017), were evaluated, and the Holstein breed was identified as significant in the multinomial model. Thus, further studies using machine learning techniques are warranted to assess the viability of infrared thermography as a diagnostic method for subclinical bovine mastitis in pasture-raised herds, including in other cattle breeds.

The parameters used for the udder thermographic evaluation (HOT, COLD, and MED) were significant for identifying the microorganisms, as were the effects of the season and the cows' body temperature. According to Thom et al. (1959) and Buffington et al. (1981), THI-T and THI-B are indices that encompass intrinsic and extrinsic variables to the animals. They were also significant in identifying microorganisms through infrared thermography.

Regarding the two analyzed models, the multilevel binary logistic model allowed for the prediction of mastitis occurrence, whereas the multinomial model enabled the prediction of the infectious agent category causing mastitis. The ROC curves for both models were compared (Figure 2).

The ROC curve for the binary model was similar ($p>0.05$) to that of the multinomial model only for the "*S. aureus*" category, while the ROC curves for the "N" and "CNS" categories were lower ($p<0.05$), and the ROC curves for the "*S. dysgalactiae*" and "*S. uberis*" categories were higher ($p<0.05$).

The choice of the best fit for a mathematical model is determined by estimating parameters for all possible structures and comparing performance

indices. The Akaike Information Criterion (AIC) and the Bayesian Information Criterion (BIC) seek balance between a good fit and the number of parameters. Thus, simpler models tend to perform better when estimating new data (Dellaportas et al., 2002; Faraco et al., 2008). In the comparison between models, the multilevel binary logistic model obtained an AIC value of 279.5 and a BIC value of 296.6, while the multinomial logistic model resulted in poorer values (AIC = 431 and BIC = 654). Therefore, the multilevel binary model is simpler, as it contains fewer predictive variables, and demonstrates a better predictive potential for mastitis occurrence.

Since the use of the multinomial logistic machine learning model exhibits lower predictive power for diagnosing cows with subclinical mastitis, it is suggested to combine the use of both models for mastitis diagnosis based on infrared thermography data. The multilevel binomial model could serve as a screening method to identify positive animals for subclinical mastitis, followed by the application of the multinomial model to determine the infectious etiology of the disease.

CONCLUSION

Infrared thermography showed potential in predicting subclinical bovine mastitis caused by *S. aureus*, *S. uberis*, and *S. dysgalactiae* in cows submitted to robotic milking with the aid of machine learning techniques, provided it is evaluated in conjunction with other intervening variables. The use of a combination of machine learning models can optimize the identification of mastitis-causing pathogens. Therefore, further studies are required for the validation of predictive models for subclinical mastitis under different management conditions and in other cattle herds.

REFERENCES

Altman, D. G., J. M. Bland. 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *British Medical Journal*. 308(6943): 152. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1552>.

Ankinakatte, S., E. Norberg, P. Løvendahl, D. Edwards, S. Højsgaard. 2013. Predicting mastitis in dairy cows using neural networks and generalized additive models: A comparison. *Computers and electronics in agriculture*. 99(1): 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.08.024>.

Anglart, D., C. Hallén-Sandgren, U. Emanuelson, L. Rönnegård. 2020. Comparison of methods for predicting cow composite somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*. 103(9): 8433-8442. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18320>.

Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*. 77(7): 2044–2050. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6).

Bach, A., V. Cabrera. Robotic milking: Feeding strategies and economic returns. 2017. *Journal of Dairy Science*. 100(9): 7720-7728. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11694>.

Barcelos, M. M., L. Martins, R. C. Grenfell, L. Juliano, K. L. Anderson. 2019. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50(3): 849-857. doi: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>.

Barros, A. J., V. N Hiraakata. 2003. Alternatives for Logistic Regression in Cross-Sectional Studies: An Empirical Comparison of Models That Directly Estimate the Prevalence Ratio. *BMC Medical Research Methodology*. 3(21): 1-13. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2288-3-21>.

Bates, D., M. Mächler, B. Bolker, S. Walker. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 67(1), 1–48. doi: <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.

Bobbo, T., R. Matera, G. Perdotà, A. Manuaza, A. Cotticelli, G. Neglia, S. Biffani. 2022. Exploiting machine learning methods with monthly routine milk recording data and climatic information to predict subclinical mastitis in Italian Mediterranean

buffaloes. *Journal of Dairy Science*. 106(3): 1942-1952. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22292>.

Buffington, D. E., A. Collazo-Arocho A, G .H, Canton, D. Pitt, W. W. Thatcher, R. J. Collier. 1981. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transactions of the ASAE*. 24(3): 711-0714 10. doi: <https://doi.org/13031/2013.34325>.

Busanello, M., R. S. Rossi, L. D. Cassoli, J. C. Pantoja, P. F. Machado. 2017. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 100(8): 6545-6553. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>.

Cardozo, L. L., A. Thaler Neto, G. N. Souza, L. C. A. Picinin, N. C. Felipus, N. L. M. Reche, F. A. Schmidt, D. Werncke, E. E. Simon. 2015. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *Journal of Dairy Science*. 98(11): 7675-7685. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8913>.

Capellari, J., A. J. Rossi, R. M. Bonotto. 2022. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Chapecó, SC. *Gestão e Tecnologia no Agronegócio*. 1(2): 11-21. <https://revistas.uceff.edu.br/inovacao/article/view/15/13>.

Costa, A. N. L., J. V. Feitosa, P. A. Montezuma, P. T. Souza, A. A. Araújo. 2015. Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. *International Journal of Biometeorology*. 59(1): 1647-1653. doi: <https://doi.org/10.1007/s00484-015-0971-4>.

Costa, H. N., C. F. A. Lage, V. M. R. Malacco, A. L. Belli, A. U. Carvalho, E. J. Facury, L. R. Molina. 2019. Frequency of microorganisms isolated at different stages of lactation and milk production loss associated with somatic cell count and to mastitis-causing pathogens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 71(2): 393-403. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10185>.

Daltro, D.S., V. Fischer, E. P. M. Alfonzo, V. C. Dalcin, M. L. Stumpf, G. J. Kolling, M. V. G. B. Silva, C. Mcmanus, C. 2017. Infrared thermography as a method for evaluating the heat tolerance in dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46 (5): 374–383. doi: <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000500002>.

Ebrahimi, M., M. Mohammadi-Dehcheshmeh, E. Ebrahimi, K. R. Petrovski. 2019. Comprehensive analysis of machine learning models for prediction of sub-clinical

mastitis: Deep Learning and Gradient-Boosted Trees outperform other models. *Computers in Biology and Medicine*. 114(1): 103456. doi: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.103456>.

Faraco, M. A., M. A. Uribe-Opazo, E. A. A. D. Silva, J. A. Johann, J. A. Borssol. 2008. Seleção de modelos de variabilidade espacial para elaboração de mapas temáticos de atributos físicos do solo e produtividade da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 32(1): 463-476. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000200001>.

Felippe, E. W., I. P. de Oliveira Gomes, A. T, Neto. 2017 Comparação de vacas mestiças Holandês x Jersey com vacas puras quanto à eficiência produtiva e reprodutiva. *Archives of Veterinary Science*. 22(2): 48-54. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v22i2.45478>.

Ferland, J., E. Vasseur, M. Duplessis, E. A. Pajor, D. Pellerin. 2016. Economic impact of introducing automatic milking system on Canadian dairy farms. *Journal of Animal Science*. 94(5): 600-601. doi: 601, <https://doi.org/10.2527/jam2016-1246>.

Hanley J. A. (1989). Receiver Operating Characteristic (ROC) methodology: the state of the art. *Critical Reviews in Diagnostic Imaging*. 29(3): 307–335.

Hyde, R. M., P. M. Down, A. J. Bradley, J. E. Breen, C. Hudson, K. A. Leach, M. J. Green. 2020. Automated prediction of mastitis infection patterns in dairy herds using machine learning. *Scientific Reports*. 10(1): 4289. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61126-8>.

Hovinen, M., S. Pyorala. 2011. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *Journal of Dairy Science*. 94(1): 547-562. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3556>.

Israel, L. F. S., R. F. Rabello, S. C. B. Domingos, L. S, Medeiros. 2018. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 70(6): 1943-1949. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9866>.

Israel, L. F. S., R. F. Rabello, R. B. Ferreira, R. C. Peruquetti, L. S. Medeiros. 2022. Biofilm production by *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in dairy herds in state of Acre, Brazil and its implications. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 74(1): 563-575. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12271>.

Jabour, F. G., R. M. O. Figueiredo, C. A. Mourão-Junior. 2022. Aprendizado de Máquinas aplicado ao diagnóstico por imagem: uma revisão integrativa. *Conjecturas*. 22(7): 265-284. doi: <https://10.53660/CONJ-S33-1167>.

Jacobs, J. A., J. M. Siegford. 2012. Invited review: the impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*. 95(1): 2227-2247. doi: <https://10.3168/jds.2011-4943>.

Kaplan, J. FastDummies: Fast Creation of Dummy (Binary) Columns and Rows from Categorical Variables. R package version 1.6.3, 2020.

Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. C. W. Winn junior. 2001. Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido. 5. ed. Medsi. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Kuhn, M. Building Predictive Models in R Using the Caret Package. 2008. *Journal of Statistical Software*. 28(5): 1-26. doi: <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>.

Lopes, B. C., M. de Pinho Manzi, H. Langoni. 2018. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. *Veterinária e Zootecnia*. 25(1): 173-179. doi: <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.41>.

Lüdecke, D. 2023. sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science. R package version 2.8.14, <<https://CRAN.R-project.org/package=sjPlot>>.

Machado, N. A. F., L. B. S. Da Costa, J. A. D. Barbosa-Filho, K. P. L. De Oliveira, L. C. De Sampaio, M. S. M. Peixoto, F. A. Damasceno. 2021. Using infrared thermography to detect subclinical mastitis in dairy cows in compost barn systems. *Journal of Thermal Biology*, 97(102881): 1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102881>.

Martins, J. D., E. S. Nicolau, A. J. Mesquita, E. A. G. V. Jardim. 2015. Mastite subclínica em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 9(2): 206-214. doi: <http://doi.org/10.5935/1981-2965.20150019>.

Melo, P. C., L. M. Ferreira, A. Nader-filho, L. F. Zafalon, H. I. Godoy Vicente. 2011. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de

Staphylococcus aureus isolados de casos de mastite subclínica bovina. Bioscience Journal. 28(1)94-99. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-912361>.

Mukaka M. M. 2012. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. Malawi Medical Journal. 24(3): 69–71. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638278/>.

Dellaportas, P., J. J. Forster, I. Ntzoufras. 2002. On bayesian model and variable selection using mcmc. Statistics and Computing, 12(1): 27–36. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1013164120801>.

Nonnemann, B., U. Iyhs, L. Svennesen, K. A. Kristensen, I. C. Klass, K. Pedersen. 2019. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Dairy Science. 102(3): 2515-2524. doi: <https://10.3168/jds.2018-15424>.

Oliver, S. P., M. J Lewis, B. E. Gillespie, H. H. Dowlen, E. C. Jaenicke, R. K. Roberts. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. National Mastitis Council, Verona, Italy.

Ohnstad, I., R. O. Riekerink, P. Hogewerf, C. A. J. M. De Koning, H. W. Barkema. 2012. Effect of automatic postmilking teat disinfection and cluster flushing on the milking work routine. Journal of Dairy Science. 95(5): 2567-2570. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4946>.

Pezeshiki, A., P. Stordeur, H. Wallemacq, F. Schynts, M. Stevens, P. Boutet, L. J. Peelman, B. D. Spiegeleer, L. Duchateau, F. Bureau, C. Burnvenich. 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. Veterinary Research. 42(1): 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-15>.

Pinto, M., J. V. S. Fuzatti, R. C. Camargo, R. A. B. Silva, M. Silva Garcia, D. F. R. Frias. 2021. Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista. Brazilian Journal of Development. 7(2): 19184-19192. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-525>.

Robin, X., N. Turck, A. Hainard, N. Tiberti, F. Lisacek, J. Charles, S. Muller, M. Muller. 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC Bioinformatics. 12(1): 1-8. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>.

Ruegg, P. L. A. 2017. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*. 100(12): 10381–10397. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.

R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Santos, D. C., C. C. Lange, P. Avellar-Costa. 2016. *Staphylococcus chromogenes*, a Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species That Can Clot Plasma. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(5):1372-1375. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.03139-15>.

Santos, M. V., L. F. L. Fonseca. 2019. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. 1 ed. Edição dos autores. Pirassununga, São Paulo, Brasil.

Sathiyabarathi, M., S. Jeyakumar, A. Manimaran, G. Jayapreakash, H. A. Pushpdass, M. Silvaram, K. P. Ramesha, D. N. Das, M. A. Kataktaaware, M. A. Prakash, R. D. Kumar. 2016. Infrared thermography: a potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. *Veterinary World*. 9(10): 1075-1081. doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1075-1081>.

Sharifi, S., A. Pakdel, M. Ebrahimi, J. M. Reecy, S. Fazeli Farsani, E. Ebrahimie. 2018. Integration of machine learning and meta-analysis identifies the transcriptomic bio-signature of mastitis disease in cattle. *PLoS one*. 13(2): e0191227 doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191227>.

Sinha, R., M. Bhakat, T. K. Mohanty, A. Ranjan, R. Kumar, S. A. Lone, A. Rahim, A. R. Paray, K. Khosla, Z. Danish. 2018. Infrared thermography as noninvasive technique for early detection of mastitis in dairy animals - A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 37(1): 1-6. doi: <https://doi.org/10.18805/ajdfr.R-1746>.

Thom, E. C. The discomfort index. Washington: Weather Bureal; 1959.

Topol, E. J. 2019. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nature Medicine*. 25(1): 44-56. doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0300-7>.

Venables, W. N., B. D. Ripley. 2002 *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York, United States of America.

Wei, R., J. Wang. 2018. MultiROC: Calculating and Visualizing ROC and PR Curves Across Multi-Class Classifications. R package version 1.1.1.

Yang, C., G. Li, X. Zhang, X. Gu. 2018. Udder skin surface temperature variation pre- and post- milking in dairy cows as determined by infrared thermography. *Journal of Dairy Research*. 85(1): 201-203. doi: <https://doi.org/10.1017/S0022029918000213>.

Zaninelli, M., V. Redaelli, F. Luzi, V. Bronzo, M. Mitchell, V. Dell'Orto, V. Bontempo, D. Cattaneo, G. Savoini. *Sensors (Basel)*. 2018 Mar 14;18(3):862. doi: 10.3390/s18030862.

FIGURES

Figure 1. Accuracy, sensitivity, and specificity at different cutoff points in the multilevel binary model for predicting subclinical bovine mastitis in robotic milking using infrared thermography as an auxiliary diagnostic method.

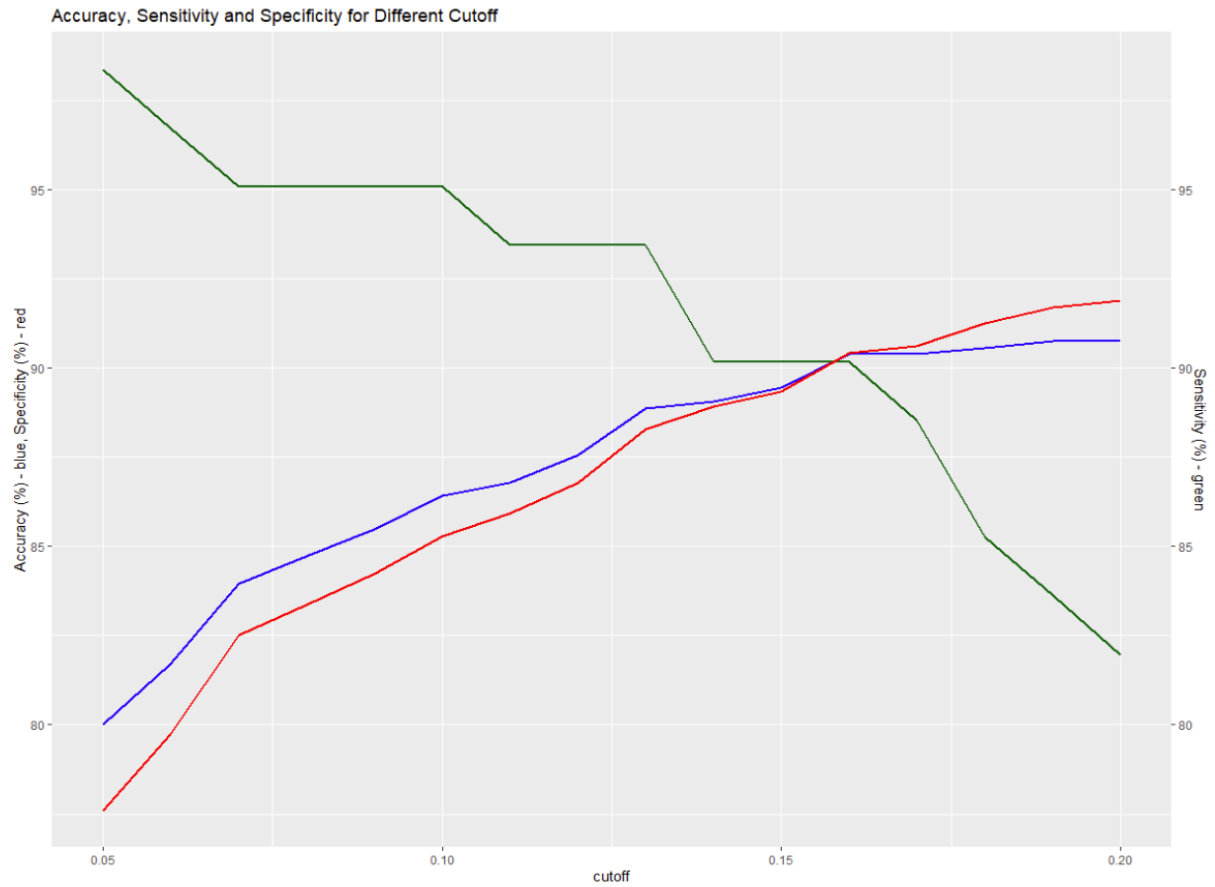


Figure 2. Comparison between the ROC curves of the multilevel binary logistic model (LogBinmixed) and the microorganism categories of the multinomial logistic model using infrared thermography as an auxiliary method for diagnosing subclinical bovine mastitis in voluntary milking.

