

BRUNNA DE MATTOS GRANJA

**Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de
microrganismos causadores de mastite bovina**

Pirassununga

2020

BRUNNA DE MATTOS GRANJA

**Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de
microrganismos causadores de mastite bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

De acordo: Marcos Veiga dos Santos

Orientador

Pirassununga

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3922
FMVZ

Granja, Brunna de Mattos
Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de
microrganismos causadores de mastite bovina / Brunna de Mattos Granja. – 2020.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga,
2020.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Cultura na fazenda. 2. Mastite. 3. Meios cromogênicos. 4. Vaca leiteira. I. Título.

**CERTIFIED**

We certify that the Research "Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of bovine mastitis-causing microorganisms", protocol number CEUAX 4102020419 (ID 001133), under the responsibility Marcos Veiga Dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day May 29, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina", protocolado sob o CEUAX nº 4102020419, sob a responsabilidade de Marcos Veiga Dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 29 de maio de 2019.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GRANJA, Brunna de Mattos

Título: Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Àqueles que nunca mediram esforços para me dar educação, oportunidades e, principalmente, todo amor do mundo. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Aos meus amados pais, José (in memoriam) e Deocélia, toda minha gratidão e eterno amor.

AGRADECIMENTOS

À espiritualidade, por me manter firme nos meus objetivos, por me fazer uma pessoa melhor todos os dias e por iluminar o meu caminho a cada passo dado. À minha religião, a minha Umbanda, que me deu a base por todos esses anos, base de fé, comprometimento, dignidade e humildade. Aos Orixás por sempre me mostrarem que sou capaz e que todos problemas têm soluções, basta acreditar e correr atrás.

Aos meus pais, José (in memmorian) e Deocélia, que sempre, independentemente de qualquer dificuldade, nunca saíram do meu lado e sempre me orientaram e apoiaram minhas escolhas. Em especial, ao meu pai, que acompanha lá de cima cada conquista alcançada.

À minha família que mesmo de longe sempre me motivou e esteve de braços abertos para o que fosse preciso. Aos meus irmãos, meus primos, meu Tio Quirino e minha tia Vera, que são meus segundos pais. As minhas amigas do coração Bárbara, Bruna, Carolina e Anna Paula, que foram meu ombro amigo em tantos momentos de alegrias, de conquistas e tristezas, se mantendo firmes por tantos e tantos anos. Obrigada.

À minha família espiritual, meus irmãos e amigos, que desde sempre me apoiaram, me dando força, alegrias e sempre acreditando em mim. Ao meu Sacerdote Luiz Santos, obrigada por sempre me orientar e me mostrar o melhor caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, pela confiança depositada, e por cada oportunidade a mim concedida nesses anos. Agradecer principalmente por ter permitido que eu realizasse este trabalho, o qual me orgulho muito de cada conquista.

A toda equipe do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP), que sempre nos orientam e auxiliam da melhor forma possível. Obrigada pela atenção e o carinho desde as meninas dos serviços gerais, até o querido João Paulo.

A toda equipe do Laboratório Qualileite, pela parceria e amizade tanto dentro como fora do ambiente de trabalho, em especial ao Carlos Eduardo Fidelis, Bruna Alves Gomes e Breno Garcia que se mantiveram firme até o final dessa jornada. Aos meus amigos queridos que passaram pela minha trajetória, Gustavo Freu e Melina Barcelos, obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O meu agradecimento também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPQ) e a OnFarm pela concessão da bolsa de mestrado (2019/2), permitindo a realização do presente estudo com maior tranquilidade.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela oportunidade de estudo e conhecimento.

'A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original '

Albert Einstein

RESUMO

GRANJA, B. M. 2020. **Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina.** [Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of bovine mastitis-causing microorganisms]. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

Este estudo objetivou avaliar o desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade, Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite clínica (MC) e subclínica (MSC). Para tanto, dois experimentos foram realizados: 1) Avaliação de biplaca de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite; 2) Avaliação de triplaca de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite. Em ambos estudos (1 e 2), a identificação de microrganismos com o uso de meios cromogênicos baseou-se na leitura visual da coloração das colônias microbianas após 18 a 24 h de incubação. Para avaliação da Ac, Se, Sp, VPP, VPN e *k* dos meios cromogênicos a identificação dos microrganismos por espectrometria de massas (MALDI-TOF) foi considerada a metodologia padrão. No experimento 1, foram avaliadas 476 amostras de leite coletadas de vacas com MC e 660 de MSC, as quais foram inoculadas em dois meios de cultura cromogênicos seletivos para bactérias Gram-positivas (GP) e outro para Gram-negativas (GN) (CHROMagar, França). No experimento 2 foram avaliadas 476 amostras de leite de vacas com MC e 500 de vacas com MSC, as quais foram inoculadas em triplaca de meios de cultura cromogênicos (Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil), seletivos para *Streptococcus*, *Staphylococcus* e bactérias Gram-negativas. No experimento 1, do total de amostras de MC houve crescimento de colônias com morfologia única em 53,6% das amostras (255/476) e em 2,7% (13/476) com duas morfologias. O uso de biplacas com os meios de cultura GP/GN apresentou Ac que variou de 95% (*Strep. agalactiae/dysgalactiae*) a 100% (*Pseudomonas* spp.). Com relação às amostras de MSC, houve crescimento de colônias com uma morfologia em 31,1% (205/660) das amostras e com duas morfologias em 4,5% (30/660). A acurácia nessas variou de 95% (*Strep. uberis*) a 100% (*Klebsiella/Enterobacter/Citrobacter; Pseudomonas* spp.) em amostras de MSC. No experimento 2, do total de amostras de MC, houve crescimento de colônias com morfologia única em 53,2% (253/476) das amostras e com duas morfologias em 4,2% (20/476). A Ac da triplaca de meios cromogênicos em amostras de MC variou de 93%

(*Staph. não-aureus*) a 99% (*Pseudomonas* spp.). Para as amostras de MSC, houve crescimento de colônias com uma morfologia em 60,2% (301/500) das amostras e com duas morfologias em 7,4% (37/500). O uso da triplaca com os meios de cultura cromogênicos em amostras de MSC, apresentou Ac que variou de 87% (*Staphylococcus* não-aureus) a 100% (*Pseudomonas* spp.). O uso dos métodos de biplaca e da triplaca de meios de cultura cromogênicos apresentou alta acurácia (Ac >92%) para os diagnósticos dos principais microrganismos causadores de mastite, o que indica que podem ser utilizados em sistemas de cultura na fazenda, com base na visualização de coloração de colônias dos principais patógenos causadores de mastite.

Palavras-chave: Cultura na fazenda. Mastite. Meios cromogênicos. Vaca leiteira.

ABSTRACT

GRANJA, B. M. 2020. **Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of bovine mastitis-causing microorganisms.** [Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina]. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

This study aimed to evaluate the diagnostic performance (specificity, Sp; sensitivity; Se; accuracy, Ac; positive predictive value, PPV; negative predictive value, NPV; and Cohen's kappa coefficient of agreement, k) for chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms that cause clinical (CM) and subclinical (SCM) mastitis. For this, two experiments were carried out: 1) Evaluation of biplate of chromogenic culture media for rapid identification of mastitis-causing microorganisms; 2) Evaluation of tri-plate of chromogenic culture media for rapid identification of mastitis-causing microorganisms. In both studies (1 and 2), the identification of microorganisms using chromogenic media was based on the visual reading of the color of the microbial colonies after 18 to 24 h of incubation. For the evaluation of Ac, Se, Sp, PPV, NPV and kappa coefficient of chromogenic media, the identification of microorganisms by mass spectrometry (MALDI-TOF) was considered the standard methodology. In experiment 1, 476 milk samples collected from cows with CM and 667 from SCM were inoculated in two culture media selective for Gram-positive (GP) bacteria and another for Gram-negative (GN) (CHROMagar, France). In experiment 2, 476 milk samples from cows with CM and 500 from cows with SCM were inoculated in three chromogenic culture media, selective for *Streptococcus*, *Staphylococcus* and Gram-negative bacteria (Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brazil). In experiment 1, of the total number of CM samples, 53.6% (255/476) had growth of colonies with one morphology and 2.7% (13/476) with two morphologies. The use of biplates with GP / GN culture media showed Ac that ranged from 95% (*Strep. agalactiae* / *dysgalactiae*) to 100% (*Pseudomonas* spp.). Regarding the samples of SCM, 31.1% (205/660) had growth of colonies with one morphology and 4.5% (30/660) with two morphologies. The accuracy for SCM samples ranged from 95% (*Strep. uberis*) to 100% (*Klebsiella* / *Enterobacter* / *Citrobacter*; *Pseudomonas* spp.). In experiment 2, of the total number of CM samples, 53.2% (253/476) had growth of colonies with one morphology and 4.2% (20/476) with two morphologies. The Ac of the triple plate with chromogenic media in CM samples ranged from 93% (*Staph. Non-aureus*) to 99% (*Pseudomonas* spp.). For SMC samples, 60.2% (301/500) had growth of colonies with one morphology and 7.4% (37/500)

with two morphologies. The Ac use of the triple plate with chromogenic culture media in SCM samples varied from 87% (*Staphylococcus non-aureus*) to 100% (*Pseudomonas* spp.). The use of the bi-plate and tri-plate of chromogenic culture media showed high accuracy (Ac > 92%) for the diagnosis of the main mastitis causing microorganisms, which indicates that they can be used in on farm culture systems, based on the visualization of colony color of the main pathogens causing mastitis.

Key-words: On farm culture. Mastitis. Chromogenic media. Milky cow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colorações características de colônias de microrganismos causadores de mastite inoculados em triplaca de meios de cultura cromogênicos: 1 - *Streptococcus uberis*; 2 - *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*; 3 - *Enterococcus* spp.; 4 - *Lactococcus* spp.; 5 - *Staphylococcus aureus*; 6 - *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.; 7 - *Prototheca* spp./Levedura; 8 - *Escherichia coli*. 41

Figura 2 - Colorações características de colônias de de cepas ATCC inoculadas em biplaca de meios de cultura cromogênicos (GP/GN): 1. *Echerichia coli* 25922; 2. *Staphylococcus aureus* 21600; 3. *Staphylococcus chromogenes* 43765; 4. *Staphylococcus aureus* 25923; 5. *Streptococcus agalactiae* 13813. 73

Figura 3 - Colorações características de colônias de isolados bacterianos causadores de mastite inoculados em biplaca de meios de cultura cromogênicos (GP/GN): 1. *Staphylococcus aureus*; 2. *Staphylococcus chromogenes*; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Streptococcus uberis*; 5. *Escherichia coli*; 6. *Klebsiella* spp.; 7. *Streptococcus dysgalactiae*..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de cultura microbiológica do leite, confirmadas por MALDI-TOF MS de todas as amostras utilizadas no experimento 1, sendo amostras de MC (n = 476) e MSC (n = 660).	45
Tabela 2 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância <i>kappa</i> de Cohen, <i>k</i>) de biplaca de meios cromogênicos em amostras de leite de vacas com MC (n=476).	48
Tabela 3 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância <i>kappa</i> de Cohen, <i>k</i>) de biplaca de meios cromogênicos em amostras de leite de vacas com MSC (n=660).	49
Tabela 4 - Resultados de cultura microbiológica do leite, confirmadas por MALDI-TOF MS de todas as amostras utilizadas no experimento 1, sendo amostras de MC (n = 476) e MSC (n = 500).	51
Tabela 5 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância <i>kappa</i> de Cohen, <i>k</i>) de triplaca de meios cromogênicos* em amostras de leite de vacas com MC (n = 476)	55
Tabela 6 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância <i>kappa</i> de Cohen, <i>k</i>) de triplaca de meios cromogênicos* em amostras de leite de vacas com MC (n = 476)	56
Tabela 7 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância <i>kappa</i>	

de Cohen, k) de triplaca de meios de cultura cromogênicos* em amostras de leite de vaca com MSC (n =500)..... 57

Tabela 8 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância $kappa$ de Cohen, k) de triplaca de meios de cultura cromogênicos em amostras de leite de vacas com MSC (n= 500)..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Contagem de células somáticas
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GN	Gram-negativo
GP	Gram-positivo
MC	Mastite clínica
MS	Mastite subclínica
SNA	<i>Staphylococcus</i> não-aureus
VN	Verdadeiro negativo
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VP	Verdadeiro positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 MASTITE	21
2.1.1 Mastite Clínica.....	22
2.1.2 Mastite Subclínica.....	23
2.1.3 Uso racional de antibióticos no tratamento de mastite.....	24
2.2 DIAGNÓSTICO DE MASTITE	25
2.2.1 Cultura Microbiológica	27
2.2.2 Cultura na Fazenda	28
2.2.3 Meios de Cultura Cromogênicos	33
2.2.4 Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS).....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS	37
3.2 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DE BIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE	38
3.2.1 Avaliação da biplaca de meios de cultura cromogênicos.....	38
3.3 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DE TRIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE microrganismos CAUSADORES DE MASTITE	39
3.3.1 Avaliação da triplaca de meios de cultura cromogênicos.....	39
3.4 CULTURA MICROBIOLÓGICA	41
3.5 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS)	42
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4 RESULTADOS	44

4.1 EXPERIMENTO 1 – ANÁLISE DE BIPLACA DE MEIOS CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE	44
4.1.1 Prevalência de isolamento de microrganismos causadores de mastite	44
4.1.1.2 Mastite Clínica	44
4.1.1.3 Mastite Subclínica	44
4.1.2 Desempenho dos meios de cultura cromogênicos para identificação de microrganismos causadores de mastite	45
4.1.2.1 Mastite Clínica	45
4.1.2.2 Mastite Subclínica	46
4.1.3 Concordância (Coeficiente <i>Kappa</i>)	47
4.1.3.1 Mastite Clínica	47
4.1.3.2 Mastite Subclínica	47
4.2 EXPERIMENTO 2 – ANÁLISE DE TRIPLACA DE MEIOS CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE	50
4.2.1 Prevalência de isolamento de microrganismos causadores de mastite	50
4.2.1.1 Mastite Clínica	50
4.2.1.2 Mastite Subclínica	50
4.2.2 Desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos	51
4.2.2.1 Mastite Clínica	51
4.2.2.2 Mastite Subclínica	52
4.2.3 Concordância (Coeficiente <i>Kappa</i>)	53
4.2.3.1 Mastite Clínica	53
4.2.3.2 Mastite Subclínica	53
5 DISCUSSÃO	59
5.1 Experimento 1 - AVALIAÇÃO DE BIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE	59
5.2 Experimento 2 - AVALIAÇÃO DE TRIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE	62
6 CONCLUSÃO	67

7 REFERÊNCIAS..... 68

APÊNDICE 72

Isolados bacterianos e cepas bacterianas ATCC 72

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das doenças mais prevalentes e que mais prejuízos causa em rebanhos leiteiros. Os principais custos associados com a mastite são as perdas de produção e redução da qualidade do leite, custos com descarte do leite com resíduos de antimicrobianos, medicamentos e serviços veterinários, além de aumentar o risco de morte das vacas com mastite grave (DOWN *et al.*; 2017).

A mastite é a principal razão do uso de antimicrobianos nas fazendas leiteiras, principalmente para tratamento de mastite clínica (MC), porém, nem todos os casos de mastite clínica demandam o tratamento com antimicrobianos (JAMALI *et al.*, 2018). Um estudo recente sobre a incidência de MC no Brasil descreveu que 44% dos casos de MC não apresentaram crescimento bacteriano e cerca de 27% dos casos com cultura microbiológica positiva, são causados por outros microrganismos não bacterianos. Sendo assim, o diagnóstico rápido dos microrganismos causadores de MC permite o uso racional de antimicrobianos e a definição mais adequada de protocolos de tratamentos (TOMAZI *et al.*, 2018).

Atualmente, a maioria das fazendas leiteiras não realiza diagnósticos dos microrganismos causadores de MC, o que implica no uso de protocolos de tratamentos com antimicrobianos sem o prévio conhecimento do agente causador de mastite (MCCARRON *et al.*, 2009). Por outro lado, o envio de amostras de leite para laboratórios especializados em culturas microbiológicas apresenta limitações, visto que o intervalo de tempo entre o envio de amostra e recebimento de resultados é longo (LAGO *et al.*; 2011).

Os sistemas de cultura microbiológica na fazenda permitem a identificação presuntiva dos principais microrganismos causadores de mastite em até 24 horas. Esses sistemas envolvem o uso de meios de cultura seletivos para diferenciar os microrganismos em categorias e, em alguns casos, permite a identificação em nível de espécie (ROYSTER *et al.*, 2014). Assim, de acordo com os tipos de microrganismos causadores, pode-se definir quais casos necessitam de tratamento com antimicrobianos e os protocolos de tratamento mais adequados, o que reduz o uso desnecessário de antimicrobianos quando não há isolamento de agente causador ou quando o uso de antimicrobianos não é recomendado (LAGO *et al.*; 2011).

Os meios de cultura cromogênicos foram desenvolvidos para identificar patógenos de acordo com a coloração específica das colônias microbianas (PERRY; FREYDIÈRE, 2007). Quando comparados aos meios de cultura convencionais, os meios cromogênicos oferecem

rapidez de diagnóstico, reduzindo a utilização de testes bioquímicos e sorológicos para identificação dos patógenos (PERRY, 2017). No entanto, estudos sobre o uso de meios cromogênicos para a identificação de patógenos causadores de MC e MSC ainda são escassos e recentes.

A hipótese desse estudo é de que o uso de meios cromogênicos apresenta alta acurácia, sensibilidade e especificidade para diagnóstico dos principais agentes causadores de MC e MSC, o que permite a utilização destes meios em sistema de cultura na fazenda. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho diagnóstico, pela determinação da acurácia (Ac), da sensibilidade (Se), da especificidade (Sp), do valor preditivo positivo (VPP), do valor preditivo negativo (VPN) e do nível de concordância (coeficiente *Kappa* de Cohen) de biplacas e triplacas de meios de cultura cromogênicos para identificação de microrganismos causadores de MC e MSC em vacas leiteiras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, que ocorre em resposta à invasão de microrganismos via canal do teto, principalmente. No entanto, outras causas podem ser associadas, como traumas. Na maioria das vezes a causa está associada à infecção da glândula mamária por bactérias, mas também pode ser acometida por outros microrganismos como fungos ou algas. Esses microrganismos, ao adentrar a glândula mamária via canal do teto, conseguem colonizá-la e produzir toxinas que causam lesão no tecido secretor, levando à inflamação (BOGNI *et al.*, 2011). A ocorrência da mastite depende da interação entre hospedeiro, ambiente e microrganismo. A vaca possui mecanismos de defesa no seu organismo, principalmente na glândula mamária, protegendo-a de uma possível infecção. O canal do teto possui um material ceroso quando a vaca não está em lactação chamado queratina, que forma uma barreira física contra o agente, impedindo sua entrada na glândula mamária, assim como os componentes lipídicos da queratina que atuam como bactericidas e bacteriostáticos. Da mesma forma os músculos que compõem o esfíncter do teto mantêm o canal fechado entre as ordenhas, ajudando na proteção local. A idade da vaca também deve ser considerada, visto que quanto mais velho o animal, mais susceptível estará sua glândula mamária, devido à lesões e desgaste do esfíncter do teto (SORDILLO, 2018).

O ambiente onde a vaca se encontra deve ser levado em consideração quando se trata de um caso de mastite. O manejo dos animais de acordo com as instalações presentes na propriedade é muito importante. Animais alojados em “*free-stall*” devem ter espaço, camas limpas e secas evitando traumas na glândula mamária como o pisoteio de outros animais. Quando estão alojadas à campo, é importante a manutenção de áreas não alagadiças e pastagens de boa qualidade, por exemplo, evitando exposição à agentes ambientais e possíveis machucados nos quartos mamários. A ordenha pode influenciar de diversas formas o aparecimento de novos casos de mastite, como por exemplo, sistema de vácuo com problemas, podendo causar lesões nos orifícios dos tetos. Assim como, realizar a limpeza correta de todos os equipamentos, do ambiente e do próprio quarto mamário do animal, evitando contaminações entre vacas e até mesmo de agentes presentes no quarto mamário incorretamente higienizado, exaltando a importância da realização correta do pré e *pos-dipping* (PENRY, 2018).

Os agentes causadores de mastite possuem características individuais, os quais de acordo com as condições da vaca e do ambiente, serão ou não um problema. Os agentes podem variar em espécie, quantidade e patogenicidade, características estas que influenciam a instalação de uma nova infecção intramamária. Os agentes contagiosos são adaptados a glândula mamária da vaca, podendo ocorrer transmissão entre quartos mamários ou entre vacas em um mesmo rebanho. No entanto, microrganismos ambientais são adaptados ao local onde ficam as vacas, como a cama onde deitam, causando mastite de forma oportunista (BRADLEY, 2002). Sendo assim, a mastite pode ser classificada em MC e MS de acordo com a forma de apresentação dos sinais clínicos, e de acordo com a origem do patógeno, podendo ser contagioso ou ambiental.

Os patógenos causadores de mastite são classificados como ambientais e contagiosos de acordo com a fonte de contágio. No entanto, essa definição pode variar, visto que patógenos que tendem a ser ambientais podem também ter características contagiosas, e vice-versa. Pode-se observar um patógeno contagioso como *Staphylococcus aureus* e um ambiental como *Streptococcus uberis*, que dependendo das condições de manejo e do meio ambiente, podem variar suas características de transmissão (ZADOKS & SHUKKEN, 2006).

2.1.1 Mastite Clínica

A MC é definida pela presença de sinais de alterações visíveis, sejam sistêmicos ou apenas no leite. O leite de vacas com MC é visivelmente anormal, podendo conter coágulos,

pus, sangue ou apresentar consistência aguada e/ou espessa. O úbere pode apresentar inchaço, vermelhidão, assim como a vaca pode sentir dor na glândula mamária. Além disso, as vacas com MC podem também apresentar sinais clínicos sistêmicos, como febre, desidratação, inapetência e redução da produção de leite (ROYSTER, WAGNER, 2015).

Os casos de MC podem ser classificados de acordo com a gravidade em: leve, moderado e grave. Considera-se um caso leve quando há somente alterações visuais no leite, como mudança na consistência e coloração do leite; moderado quando há alterações no leite e no úbere, como inchaço e vermelhidão; e grave quando a vaca apresenta sinais clínicos sistêmicos, além de alterações no leite e no úbere (ADKINS; MIDDLETON, 2018). A avaliação da gravidade da infecção intramamária permite adotar protocolos específicos para tratamento das vacas acometidas e aplicação de medidas de controle (ROYSTER, WAGNER, 2015).

Os principais agentes relacionados à MC são agentes considerados ambientais, sendo comumente bactérias Gram-negativas, porém ainda há alguns *Streptococcus* spp. que são considerados como ambientais/contagiosos, como *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*, algumas espécies de bactérias podem apresentar comportamento tanto contagioso como ambiental (ZADOKS; SHUKKEN, 2006). As bactérias Gram-negativas, como por exemplo, *Escherichia coli*, pertencente ao grupo das enterobactérias é a mais frequentemente encontrada nesse tipo de infecção, visto que está presente de forma massiva nas fezes das vacas, e conseqüentemente também no ambiente. Ela acomete a vaca principalmente antes do parto e no início da lactação, períodos onde o sistema imunológico do animal pode estar um pouco debilitado. Os sinais clínicos variam, de uma MC leve até problemas sistêmicos graves (BOGNI *et al.*, 2011). Da mesma forma a *Klebsiella* spp., também pertencente ao grupo das enterobactérias é um importante patógeno quando nos referimos à MC. A infecção causada por ela geralmente tem maior tempo de duração e tem sinais clínicos mais graves (SHUKKEN *et al.*, 2012).

2.1.2 Mastite Subclínica

A MSC ocorre quando a glândula mamária da vaca está infectada e/ou inflamada, mas não estão presentes alterações visíveis no leite. No entanto, é a MSC a forma de manifestação que mais causa prejuízos à produção leiteira, como a diminuição da produção e qualidade do leite e, conseqüentemente, afeta negativamente o produtor, o laticínio e o consumidor. Assim,

como não há alterações visíveis no leite, as infecções subclínicas necessitam ser identificadas por meio de testes quantitativos ou qualitativos (ADKINS; MIDDLELTON, 2018).

A contagem de células somáticas do leite (CCS) é um método quantitativo que permite inferir se a vaca apresenta MS. Vacas com < 200.000 células somáticas/ml são consideradas saudáveis, mas quando a CCS é > 200.000 células somáticas/ml é indicativo de infecção na glândula mamária (ROYSTER *et al.*, 2015). Outra forma de diagnóstico da MSC é a realização dos testes de *California mastitis test* (CMT) ou *Wisconsin mastitis test* (WMT), os quais são qualitativos. Nestes testes, são avaliadas a mudança de viscosidade do leite, a qual tem relação direta com a quantidade de células somáticas no leite. Adicionalmente, a MSC apresenta alterações na composição do leite, como por exemplo a diminuição dos teores de lactose. A diminuição dos teores de lactose ocorre em razão dos danos causados no tecido excretor da glândula mamária pela ação da inflamação. (ADKINS; MIDDLELTON, 2018).

Em casos de MSC, os principais agentes associados são os contagiosos, sendo os mais comuns o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae*, de grande importância, visto que na maioria das vezes a MSC é de difícil detecção. O *Staphylococcus aureus* é um patógeno importante, pois é capaz de causar epidemias em rebanhos leiteiros, além de persistir por longos períodos dentro da glândula mamária, assim como o *Streptococcus agalactiae* (GOMES; HENRQUES, 2015).

2.1.3 Uso racional de antibióticos no tratamento de mastite

O uso de antibióticos promove a saúde tanto humana quanto animal, visando melhorar o bem-estar animal e a segurança alimentar. Sendo assim, é importante preservar a eficácia desses medicamentos, no uso humano e veterinário, evitando o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. A organização mundial de saúde animal (OIE) juntamente com a organização das nações unidas para alimentação e agricultura (FAO) e a organização mundial de saúde (OMS), criaram o projeto “One Health” o qual abrange as necessidades e desafios desses setores, desenvolvendo medidas para combater a resistência antimicrobiana e melhorando a biossegurança (DURSO; COOK, 2018).

Atualmente, o principal motivo do uso de antibióticos nas propriedades leiteiras são os casos de mastite, os quais se tornam cada vez mais frequentes. No entanto, há uma preocupação diretamente ligada ao uso desses medicamentos, visto que há a possibilidade de desenvolver resistência bacteriana, o que acaba trazendo prejuízos tanto para a produção leiteira quanto para

a saúde do consumidor (POIZAT *et al.*, 2017). Normalmente a escolha dos antibióticos que serão utilizados no tratamento de mastite é feita baseada na experiência do produtor, e em casos anteriores da doença, sendo deixado de lado o diagnóstico do patógeno causador (GRIFFIOEN *et al.*, 2016). Sendo assim, é de suma importância a intervenção do Médico Veterinário para a tomada de decisão nas propriedades, orientando a melhor conduta a ser seguida, assim como na prescrição dos medicamentos mais apropriados para o caso clínico de cada vaca (POIZAT *et al.*, 2017).

Para que o tratamento de mastite seja seguro e de qualidade, deve-se estar atento a diferentes fatores relacionados a vaca, como seu histórico de mastite e CCS, idade do animal, número de lactações e ao patógeno. Além disso é essencial que seja realizado o diagnóstico microbiológico para que se conheça o agente causador da infecção, direcionando para o melhor antibiótico a ser utilizado, obtendo-se um tratamento correto e de forma consciente em relação ao uso desses medicamentos (KAYITSINGA *et al.*, 2016). A dificuldade que o produtor encontra em relação ao diagnóstico microbiológico é o tempo entre o envio da amostra para o laboratório e o diagnóstico do patógeno, o que atrasa o início do tratamento dos casos de mastite (LAGO *et al.*, 2011; ROYSTER *et al.*, 2014; VIORA *et al.*, 2014; KAYITSINGA *et al.*, 2016).

Para o sucesso do tratamento de mastite é necessário conhecer e eliminar os patógenos presentes na propriedade. A partir do diagnóstico microbiológico e das características de cada vaca é possível determinar a necessidade ou não do tratamento com antibióticos. É importante ter o conhecimento que existem patógenos que não respondem ao tratamento com antibióticos, como leveduras e a alga *Prototheca* spp., ou ainda animais que apresentaram sinais clínicos de mastite, mas apresentaram cultura microbiológica negativa, e vacas que apresentam cura espontânea a partir da ação do seu sistema imunológico (KROMKER *et al.*, 2017). Em um estudo, foi possível observar que 10 a 40% dos casos de MC, apresentam cultura microbiológica com crescimento negativo, e ainda cerca de 40% dos casos de cultura positiva são de bactérias Gram-negativas, as quais tem alta taxa de cura espontânea, em ambos os casos não sendo necessário o tratamento com antibióticos (TOMAZI *et al.*, 2018). Além disso, com o conhecimento do diagnóstico do agente causador da infecção, é possível reduzir ainda em torno de 40 a 50% o uso de antibióticos nos tratamentos de mastite (KROMKER *et al.*, 2017).

2.2 DIAGNÓSTICO DE MASTITE

A mastite é a inflamação da glândula mamária, quando causada por patógenos específicos, é preciso identificar separadamente os quartos mamários afetados para que sejam realizados testes de diagnósticos necessários (DOHOO *et al.*, 2011). Assim, com o objetivo de melhorar estratégias de tratamento e controle da mastite é muito importante conhecer os patógenos envolvidos. Para tanto, os métodos mais tradicionais utilizados são a cultura microbiológica e os testes bioquímicos, no entanto, essas técnicas necessitam de tempo, o que prejudica a tomada de decisão sobre o tratamento da doença (TAPONEN *et al.*, 2009).

É fundamental ter um método de diagnóstico de mastite preciso, sendo uma solução confiável e rápida para melhorar as condições de saúde do úbere. A rapidez de diagnóstico vem sendo a principal questão estudada, visto que quanto mais cedo for o diagnóstico menor são os danos causados a vaca. Dessa forma, muitos métodos estão sendo desenvolvidos e testados, principalmente no intuito de serem utilizados diretamente na fazenda. No entanto, métodos de padrão ouro como cultura microbiológica convencional e CCS ainda são amplamente utilizados. Por outro lado, diferentes técnicas moleculares estão também sendo estudadas atualmente, como PCR, sequenciamentos, assim como nanotecnologia e testes baseados em proteínas (ASHRAF; IMRAN, 2018).

Inicialmente o diagnóstico de mastite é realizado pelas condições visuais do leite, como presença de coágulos, sangue ou pus; alterações na glândula mamária do animal; assim como possíveis alterações sistêmicas, como febre, inapetência e fraqueza. Se identificados esses sinais clínicos, é possível coletar o leite para diagnóstico e evitar que esses animais contaminem outros de forma rápida. A CCS é um método utilizado para identificar casos de mastite de acordo com o grau de infecção que o animal apresenta, no entanto é importante lembrar que as CCS podem aumentar também por outros fatores como o estresse, não somente por presença de infecção, podendo ser mensurada pelo *California Mastitis Test* (CMT), realizado na fazenda (ASHRAF; IMRAN, 2018).

Os patógenos causadores de mastite podem ser identificados por meio de métodos fenotípicos, genotípicos e por imunoenaios. A identificação fenotípica é realizada através das características do patógeno quanto ao crescimento, a morfologia, capacidade de metabolizar substratos. O método mais utilizado e considerado padrão-ouro é a cultura microbiológica convencional, que vem sendo melhorada com a utilização de meios de cultura seletivos, se tornando mais sensível. O sistema de cultura na fazenda é um método fenotípico o qual vem sendo muito utilizado por oferecer diversos benefícios, principalmente quanto a rapidez de diagnóstico, diminuição do uso de antibióticos e consequentemente redução do leite descartado.

A espectrometria de massas MALDI-TOF MS também é uma técnica utilizada para determinar espécies bacterianas, sendo fácil de usar, confiável e realizada em poucos minutos, podendo atingir valores de sensibilidade e especificidade de 100% (DUARTE; FREITAS; BEXIGA, 2015).

Já os métodos genotípicos, por outro lado, utilizam o DNA do patógeno como base para identificação, assim como a reação em cadeia da polimerase o PCR, que se tornou o método de detecção direta de proteínas mais popular, com alta sensibilidade. Há ainda métodos moleculares os quais possibilitam identificar cepas específicas, como análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sequenciamentos, entre outros. Quanto aos imunoenaios, são realizados através de kits, de forma rápida e simples, como o ELISA. (DUARTE; FREITAS; BEXIGA, 2015).

2.2.1 Cultura Microbiológica

A cultura microbiológica tem sido o método laboratorial padrão para diagnóstico de patógenos causadores de mastite. Geralmente são utilizadas técnicas microbiológicas e testes bioquímicos de forma econômica e simples de realizar. A cultura microbiológica pode ser realizada em amostras de leite de tanque ou de vacas individualmente (ADKINS; MIDDLETON, 2018).

O método de cultura microbiológica convencional consiste na inoculação de amostras de leite (10 uL) em meios de cultura não seletivos (Ex. ágar sangue) seguidos de incubação por 24-48h a 37°C. O crescimento das colônias bacterianas no ágar é avaliado com base em características como: número de colônias, tamanho, pigmentação, hemólise e morfologia. Após o isolamento primário, testes complementares (bioquímicos) são necessários para o diagnóstico definitivo do agente causador (PERRY; FREYDIÈRE, 2007).

O protocolo de diagnóstico mais utilizado para a cultura microbiológica convencional é o recomendado pelo NMC (2017). Após a inoculação em meio de cultura Ágar Sangue e incubação por 24-48h a 37°C, os testes complementares são realizados. A partir da amostra com crescimento positivo, selecionam-se colônias características para realizar o teste de Catalase, para identificação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.; assim como, teste de Hidróxido de Potássio (KOH), para diferenciação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. São preparadas lâminas com coloração de Gram, as quais são avaliadas quanto à morfologia das colônias. Quando é feita a identificação de *Streptococcus* spp., as colônias são submetidas ao

teste de CAMP, um meio de cultura específico onde *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* são diferenciados. As colônias negativas no teste do CAMP são submetidas ao teste de bile esculina, para identificar *Streptococcus uberis* e outros estreptococos. Quando é feita a identificação de *Staphylococcus* spp., é realizado o teste de Coagulase, para diferenciar os *Staphylococcus* coagulase-negativa e o *Staphylococcus aureus*. Para bactérias Gram-negativas, é realizado teste de Oxidase, para identificação de *Pseudomonas* spp. e coliformes, quando negativo são realizados testes bioquímicos para identificação da espécie bacteriana.

Entre as limitações existentes na cultura microbiológica padrão, o tempo entre a chegada do leite no laboratório para análise e a emissão do laudo de diagnóstico são problemas enfrentados pelos produtores. A demora de 5 a 7 dias para fechar um diagnóstico de mastite, implica na piora do estado de saúde do animal, descarte do leite e, por fim, a realização de um tratamento não específico no quarto mamário afetado (LAGO *et al.*, 2011). Com isso, produtores têm mostrado cada vez mais interesse em outros métodos de diagnóstico que o ajudem a conhecer o agente causador de mastite em seus animais de forma mais rápida (GRIFFIOEN *et al.*, 2016).

Um estudo realizado a partir da opinião de produtores de leite em relação ao diagnóstico de mastite (GRIFFIOEN *et al.*, 2016), mostrou que 64% produtores sentem a necessidade de ter acesso a um teste microbiológico que auxilie no diagnóstico de MC, assim como para saber qual antimicrobiano seria mais indicado para o tratamento. Da mesma forma para MSC, em que 57% tiveram a mesma opinião, assim como 31% gostariam de saber a necessidade de estender o tratamento antimicrobiano, a partir da análise microbiológica. Quando questionados sobre a preferência de cultura microbiológica para diagnóstico de MC, 53% responderam que estavam dispostos a utilizar (às vezes ou sempre) a cultura padrão realizada em laboratório. Por outro lado, 71% preferiram a cultura na fazenda, sendo o tempo gasto para diagnóstico o principal motivo de escolha, seguido do preço.

2.2.2 Cultura na Fazenda

O sistema de cultura microbiológica na fazenda está se tornando uma alternativa de diagnóstico implantado em rebanhos leiteiros para tratamento direcionado da mastite, especialmente em sua forma clínica. O princípio é obter um diagnóstico presuntivo rápido do agente causador de mastite em vacas leiteiras, entre 18-24 horas após a coleta do leite, e permitir

aos produtores tomar decisões de tratamento, escolhendo o melhor protocolo terapêutico dos animais acometidos (BOGNI *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2018). A utilização de meios de cultura seletivos, traz para esse sistema a capacidade de diferenciar grupos de patógenos, e em alguns casos até mesmo a espécie dos mesmos (ROYSTER *et al.*, 2014).

No entanto, o emprego desse sistema nas propriedades leiteiras vai depender do objetivo do produtor, podendo ser realizada em casos de MC e MSC (BOGNI *et al.*, 2011). Além disso, esse sistema além de simplificar o diagnóstico da mastite, ele pode ser realizado por qualquer colaborador da propriedade, desde que seja previamente treinado. (VIORA *et al.*, 2014).

Para definir qual sistema de cultura na fazenda é apropriado, visando o diagnóstico rápido devem-se considerar diferentes fatores, por exemplo, precisão do método, custo, prazo de validade, condições de uso, estrutura necessária para realização dos procedimentos. Porém, é de extrema importância que os resultados obtidos através do sistema auxiliem o técnico a definir o tratamento adequado, dentro do manejo utilizado dentro da fazenda. Como por exemplo, se no protocolo de tratamento da fazenda é utilizada terapia com antibióticos apenas para bactérias Gram-positivas, então um sistema que diferencie os patógenos em Gram-positivos e Gram-negativos é suficiente. Porém existem fazendas que adotam o tratamento a partir da espécie do patógeno. Além disso, não somente o diagnóstico preciso basta para esse sistema ter sucesso dentro da fazenda, mas é importante a decisão a ser tomada em relação ao tratamento do patógeno identificado na infecção intramamária. Todos esses fatores envolvem a diminuição do uso de antibióticos no tratamento de mastite, mantendo a eficácia dos tratamentos e não afetando a longo prazo a saúde dos animais. Diversos benefícios envolvem a diminuição do uso de antibióticos no tratamento de mastite, como o menor risco de resíduos no leite, a diminuição dos custos de tratamento e principalmente a diminuição do risco de resistência bacteriana a esses medicamentos (LAGO & GODDEN, 2018).

Um estudo utilizou 282 amostras de leite fresco com mastite para avaliar o sistema CF em uma triplaca (*Minnesota Easy Culture System II Tri-plate*) contendo três meios de cultura (Ágar Factor, MKTK e MacConkey) e no 3M Petrifilm STX, comparando-os à análise microbiológica padrão, no intuito de identificar *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. Os testes foram avaliados por um técnico de laboratório e por quatro pessoas sem nenhum conhecimento técnico. Como resultado obtido para a triplaca em relação aos observadores, valores médios de 94,92% de especificidade, 68,62% de VPP (valor preditivo positivo) e 90,25 de VPN (valor preditivo negativo) para *Staphylococcus aureus*; ao passo que, para *Streptococcus* spp., mostrou-se a partir da avaliação do técnico de laboratório, uma

sensibilidade de 92,6%, especificidade de 89,5%, VPP de 79,8% e VPN de 96,4%. Para os resultados obtidos pelo Petrifilm a partir da observação apenas do técnico do laboratório, foi possível observar 92,1% de sensibilidade, 93,1% de especificidade, 76,1% de VPP e 98% de VPN, referentes ao *Staphylococcus aureus* (MACCARRON *et al.*, 2009).

A partir da pesquisa originada no Laboratório de Saúde do Úbere na Universidade de Minnesota, foram analisadas 283 amostras de MC e MS. As amostras foram inoculadas simultaneamente em três tipos de meio de cultura: 1. Cultura microbiológica padrão, interpretada por um técnico de laboratório; 2. *Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate*, interpretado individualmente por dois observadores inexperientes; 3. *Minnesota Easy Culture System II Tri-Plate*, interpretado individualmente por dois observadores inexperientes. A partir das análises da biplaca (*Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate*), os resultados para acurácia, especificidade e VPN foram altos (>80%), assim como para VPP (>80%); para sensibilidade (>60%) foi intermediário. Em relação às triplacas (*Minnesota Easy Culture System II Tri-Plate*), foram observados valores altos (>80%) de especificidade, acurácia e VPN. Para sensibilidade e VPP os resultados foram intermediários (>60%) ou altos (>80%), todos relacionados à categorias de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e amostras sem crescimento, assim como para *Streptococcus spp.*, e *Staphylococcus spp.* Por fim, concluiu-se que ambos sistemas de cultura são ferramentas úteis para os produtores de leite no intuito de obter rapidamente o diagnóstico de MC, auxiliando nas decisões estratégicas ou seletivas de tratamento (ROYSTER *et al.*, 2014).

Em estudo realizado a partir de três rebanhos leiteiros escoceses, foram avaliadas 231 amostras de leite de MC e MSC. Comparou-se a cultura microbiológica laboratorial padrão com um kit de diagnóstico rápido de mastite (VetoRapid, Vetoquino) para avaliar a utilização de tratamento seletivo. O teste compreende uma triplaca, contendo três meios de cultura: 1. Ágar específico contendo sais biliares e vancomicina; 2. Ágar sal manitol modificado (MSA); 3. Ágar Edwards modificado. Foram quantificados resultados referentes à especificidade, sensibilidade, a partir da avaliação de falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN), quando se compararam os dois métodos de diagnóstico. Foram obtidos resultados de sensibilidade e especificidade do kit VetoRapid para identificação de *Escherichia coli* (58% e 98%), *Staphylococcus aureus* (28% e 93%), *Staphylococcus coagulase negativo* (28% e 93%), *Streptococcus uberis* (65% e 94%) e *Enterococcus spp.* (17% e 93%). Sendo assim, a identificação de bactérias e implementação do tratamento seletivo a partir do uso do kit VetoRapid é adequado, variando sua confiabilidade para cada patógeno causador,

oferecendo suporte ao manejo de tratamento de mastite efetivo dentro da propriedade (VIORA *et al.*, 2014).

Além de reduzir o uso de antibióticos durante a lactação, o sistema de cultura na fazenda também pode ser utilizado na terapia seletiva de vaca seca. Um estudo realizado com 16 rebanhos, comparou a terapia geral de vacas secas com o tratamento seletivo de vacas com base nos resultados do de cultura na fazenda, utilizando Petrifilm. Foi possível visualizar a diminuição do uso de antimicrobianos dentro da propriedade e o uso de selante de tetos naqueles animais que não foram tratados no período seco auxiliou na manutenção da saúde da vaca, assim como não afetou sua próxima lactação (CAMERON *et al.*, 2015). A cultura na fazenda aliada ao tratamento seletivo de vacas secas está se tornando uma tecnologia de grande importância, tanto voltado à diminuição dos custos gerais dos tratamentos quanto em relação a diminuição do uso de antibióticos na propriedade leiteira, que pode ser reduzido drasticamente, quando bem aplicada na prática (KEEF; MACDONALD; CAMERON, 2013).

O uso de cultura na fazenda também permite selecionar vacas com MC que realmente necessitam de tratamento antimicrobiano, com o intuito de diminuir o uso de antimicrobianos. Em casos leves de MC, os quais não há crescimento na cultura microbiológica realizada na fazenda, não é recomendada a terapia antimicrobiana (VASQUEZ *et al.*, 2017). De acordo com um estudo realizado avaliando o sistema de cultura na fazenda em sete rebanhos na Nova Zelândia com 323 casos de MC foi possível observar a redução de 25% no uso de antimicrobianos com o tratamento seletivo. Estes resultados foram obtidos com base em quatro meios de cultura testados. Os quatro meios foram dispostos em uma placa de Petri com quatro quadrantes, um quadrante contendo ágar sangue com esculina, outro contendo um meio de cultura seletivo para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos, e nos outros dois quadrantes foi utilizado para os meios de cultura cromogênicos (CHROMagar, Paris, França). Essa placa foi comparada a um meio de cultura padrão foi obtido um coeficiente de concordância $k = 0,31$. Especificamente para cada agente, quando também comparados a cultura padrão, foram obtidos para os agentes *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo e bactérias Gram-negativas, os resultados de nível de concordância a partir do coeficiente $kappa$ foram 0,47, 0,34, 0,34 e 0,49, respectivamente. Com isso o estudo conseguiu mostrar que por mais que o nível de concordância entre o sistema de cultura na fazenda e a cultura microbiológica laboratorial foram moderados, ainda assim esse sistema proporciona facilidades na identificação de bactérias, sendo viável a implantação da

técnica, melhorando também a tomada de decisão frente ao tratamento de mastite (MACDOUGALL; NIETHAMMER; GRAHAM, 2018).

Diferentes sistemas de meio de cultura podem ser utilizados no sistema de CF. Neste estudo (FERREIRA *et al.*, 2018) foi avaliada em 211 amostras de leite vacas leiteiras com MC a identificação de patógenos a partir de quatro tipos de sistema de placas diferentes (1. Accumast, Minnesota Easy System; 2. SSGN; 3. SSGNC; 4. Quad plates), a partir da sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN de cada um, quando comparados a um meio de cultura convencional. Além disso foi determinado o coeficiente *kappa* para avaliar a concordância entre os métodos. Das 211 amostras de leite analisadas 84,9% não tiveram crescimento bacteriano. Os maiores valores para as três categorias gerais (sem crescimento bacteriano, bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas) foram encontrados no Accumast, que apresentou uma concordância quase perfeita com o método convencional ($k = 0,81$). Em relação aos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos ele apresentou acurácia de 90%, sensibilidade de 97%, especificidade de 85%, VPP de 82% e VPN de 98%. No entanto, de forma geral, todos os sistemas de placas foram altamente eficientes para identificar amostras de leite negativas.

Um estudo recente comparou a concordância entre quatro testes para diagnóstico de mastite baseados em meios de cultura: 1) CHROMagar Mastitis (CHROMagar, France); 2) Hardy Diagnostics Mastitis Triplate (Hardy Diagnostics, USA); 3) Minnesota Easy Culture S-II Tri-plate University of Minnesota, USA); 4) VétoRapid (Vetoquinol, the Netherlands). Esses meios de cultura foram escolhidos para o estudo por possuírem potencial para serem usados como cultura na fazenda e apresentarem diferenças entre si, como o CHROMagar e o VétoRapid que são meios de cultura cromogênicos. Foram utilizadas 866 amostras de leite e destas, 671 apresentavam leite com aspecto anormal ou apresentavam histórico de alta CCS (>200.000 células/ml). Para bactérias Gram-positivas os meios de cultura apresentaram boa concordância entre si, exceto o Hardy Diagnostics Mastitis Triplate (Hardy Diagnostics, USA) o qual apresentou concordância significativamente menor. No caso de bactérias Gram-negativas todos os meios de cultura apresentaram o mesmo nível de concordância. Pontualmente, para bactérias como a *Escherichia coli* e o grupo KEC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp.), foi observada uma concordância satisfatória quando comparados os meios de cultura CHROMagar e o VétoRapid com a cultura microbiológica convencional (GRIFFIOEN *et al.*, 2018).

2.2.3 Meios de Cultura Cromogênicos

Os meios de cultura cromogênicos, vem sendo comercializados desde 1990, tornando-se uma ferramenta para diagnóstico microbiológico (PERRY; FREYDIÈRE, 2007). Em sua maioria, são meios de cultura com potencial seletivo e diferencial. Eles inibem organismos indesejados e permite que certos microrganismos cresçam com colônias coloridas devido ao seu metabolismo, ocorrendo por hidrólise na maioria dos casos (PERRY, 2017). Na maioria dos estudos já realizados com esses meios de cultura, eles demonstram vantagens na detecção de patógenos em relação aos meios de cultura convencionais, principalmente quando há presença de mais de um patógeno. Apesar de diminuir o uso de testes adicionais e o tempo para diagnóstico, as placas de meios de cultura cromogênicos possuem valor comercial mais elevado do que as convencionais (PERRY; FREYDIÈRE, 2007).

Os meios cromogênicos possuem substratos enzimáticos que liberam corantes de acordo com o patógeno presente, fazendo com que haja diferenciação pela coloração da colônia. Os compostos cromogênicos mais utilizados que permitem a distinção por cor, são derivados do Indol. Sendo esses solúveis em água e estáveis ao calor (MANAFI, 2000), os mesmos podem ser hidrolisados por enzimas galactosidases ou glucosidases, produzindo derivados que não inibem o crescimento bacterianos (PERRY; FREYDIÈRE, 2007). O substrato cromogênico ideal deve produzir, após hidrólise, um produto colorido que se fixa em colônias bacterianas específicas. Esse pigmento permite a clara diferenciação de microrganismos que produzem a enzima específica para que ocorra a coloração e os que não produzem. Bactérias comensais devem ser inibidas completamente ou apresentar colônias incolores, permitindo que os patógenos alvos se destaquem. Este tipo de meio de cultura vem sendo estudado e desenvolvido para conhecer patógenos de alta especificidade mistas. Quando comparados aos meios de cultura convencionais apresentam vantagens devido à alta taxa de detecção de patógenos alvo e/ou diferenciação de culturas mistas (PERRY; FREYDIÈRE, 2007). Os substratos enzimáticos utilizados nos meios de cultura cromogênicos tornam esse método de diagnóstico uma alternativa de diferenciar de forma específica e rápida os patógenos presente em alimentos e até na água (MANAFI, 2000).

Frente os diferentes meios de cultura e testes utilizados para diagnóstico de *Staphylococcus aureus*, um estudo foi realizado para comparar diferentes meios de cultura. Foram utilizadas 206 isolados de cocos Gram-positivos e catalase-positivos originados de amostras de leite de vacas com mastite. Todos isolados foram recultivados em ágar sangue e

passados por identificação definitiva por PCR. Os isolados foram inoculados em diferentes meios de cultura, sendo eles: 1. BA feito de ágar contendo 5% de sangue de ovelha (Biomérieux, pronto para usar); 2. ágar BP contendo RPF (BP1, Biomérieux, pronto para uso); 3. BP2, (Oxoid, pronto para uso); 4. DNase (Becton Dickinson); 5. SAID (Biomérieux, pronto para usar); 6. VJ (Oxoid); 7. CHAP (Biolife); 8. CHROM (CHROMagar). As placas foram incubadas a 37°C por 24 e 48h e após foram avaliadas por duas pessoas que desconheciam o agente. Por fim eles mostram que para diferenciar cepas de *Staphylococcus aureus* de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, o uso do CHROM, um meio cromogênico, auxilia na diferenciação das colônias, com melhor visualização do agente. Quando comparados à avaliação por PCR, foi observado 100% de sensibilidade, 96% de especificidade e o coeficiente kappa de 0,92 para o CHROM. Na comparação com a cultura padrão, observou-se para o CHROM 100% de sensibilidade e especificidade (GRABER *et al.*, 2013).

O estudo realizado na Universidade de Cornell nos EUA avaliou três meios de cultura cromogênicos, que foram testados em uma triplaca (Accumast—FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY) quanto a sua especificidade, sensibilidade e acurácia para identificação de microrganismos de amostras de leite de vacas com MC. As amostras de leite com mastite foram avaliadas em cultura laboratorial padrão e em sequenciamento 16S rRNA. A triplaca avaliada contendo os três meios de cultura cromogênicos testados apresentou sensibilidade e especificidade geral de 82,3% e 89,9%, respectivamente. Adicionalmente, alta sensibilidade (100%) e especificidade (99,8%) foram descritas para identificação de *Staphylococcus aureus* nas amostras avaliadas. Além de amostras de leite, foram testadas nesse estudo cepas ATCC, para avaliar as características de crescimento de agentes de cultura pura nos meios de cultura cromogênicos (GANDA *et al.*, 2016).

Os meios de cultura cromogênicos podem ser utilizados para análise de outras amostras, como em um estudo que analisou a sensibilidade e especificidade de dois meios de cultura cromogênicos (Brilliance MRSA 2 Agar (Thermo Fisher Scientific) e ChromIDMRSA Agar (bioMérieux)) para identificação de 239 isolados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) originados de amostras clínicas humanas, de alimentos e de animais, quando comparados com diagnóstico por PCR. Os meios de cultura cromogênicos avaliados apresentaram em média bom desempenho de diagnóstico para sensibilidade (92%) e especificidade (89%), sendo indiferente a origem dos isolados. No entanto, o Brilliance MRSA 2 Agar (Thermo Fisher Scientific) se mostrou menos eficiente para isolados de *Staphylococcus aureus* MRSA proveniente de amostras de alimentos (MIGUEL *et al.*, 2015).

Além disso, outro estudo mostrou a utilização desses meios de cultura para identificação de bactérias ácido lácticas em produtos de leite fermentado, no intuito de diferenciar três cepas de bactérias: *L. paracasei*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, originadas diretamente dos produtos testados e também de cepas ATCC (*L. rhamnosus* ATCC 53103; *L. casei* ATCC 393; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842; *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258 combinada com *L. paracasei*). Foram utilizados dois iogurtes como amostras para avaliar dois meios de cultura cromogênicos, citados como M1 e M2, além disso as ATCC anteriormente citadas, para confirmar a relevância do método. Por fim, foi possível observar que o uso de meios cromogênicos permitiu a identificação, seleção e enumeração de todas as amostras testadas, sem a necessidade de confirmação por método molecular. Assim, os meios cromogênicos possuem vantagens como redução de tempo para obtenção de resultados, visto que há redução no tempo de incubação, assim como redução de tipos de meios de cultura necessários para identificação e diferenciação bacteriana em produtos lácteos fermentados (GALAT *et al.*, 2016).

2.2.4 Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS)

A espectrometria de massas por dessorção / ionização a laser assistida por matriz seguida por tempo de voo (MALDI-TOF MS) vem representado nos últimos tempos uma grande inovação tecnológica na área de microbiologia. O sistema de tempo de voo possibilitou separar massas diferentes, a partir da aceleração de íons em um campo elétrico, a velocidade adquirida infere no tempo necessário para os íons atravessarem o tubo de vácuo, o qual depende da massa da molécula que foi ionizada (RUIZ *et al.*, 2017). Os compostos são ionizados em moléculas carregadas e dessa maneira sua massa é medida (SINGHAL *et al.*, 2015). Essa técnica permite estudar proteínas ribossomais de microrganismos isolados e até de alta complexidade, ampliando os campos de aplicação. (RUIZ *et al.*, 2017).

A técnica de MALDI-TOF MS, vem sendo utilizada para identificação de agentes causadores de mastite. Com isso, essa tecnologia está se tornando uma nova opção para os laboratórios de pesquisa e diagnóstico, por ser uma técnica rápida, sendo necessário que o patógeno seja primeiramente cultivado, para que seja identificado no equipamento a partir de sua colônia (ADKINS; MIDDLETON, 2018).

Essa técnica de diagnóstico é amplamente aplicada na identificação de bactérias e leveduras em microbiologia clínica (SINGHAL *et al.*, 2015). A dessorção de íons nessa técnica

ocorre pela adição de uma matriz que absorve a energia do laser e a transfere para a amostra (RUIZ *et al.*, 2017). A partir da ionização das proteínas e análise da massa da amostra, são geradas informações, que com base nelas é formado um espectro, ou seja, uma impressão digital daquele agente que é comparado a um banco de dados (SINGHAL *et al.*, 2015). A identificação das espécies dos patógenos por MALDI-TOF ocorre com base na assinatura exclusiva das proteínas ribossomais microbianas, formando um banco de dados para comparação (LUTHJE *et al.*, 2017). O tempo de voo (TOF) é medido através de um campo eletromagnético criado dentro do tubo de voo, que aceleram as proteínas ribossômicas ionizadas, até que elas atinjam o detector, onde então é medido e registrado o espectro de massas. Esses espectros então, são comparados ao banco de dados de referência presente no equipamento (WILSON *et al.*, 2018).

A técnica MALDI-TOF MS revolucionou o diagnóstico de bactérias, visto que é uma técnica rápida, confiável e sensível na identificação desses agentes. Além disso, é uma técnica complementar a cultura microbiológica convencional, a qual diminui o tempo de identificação do microrganismo (BARREIRO *et al.*, 2010). Ela pode ser utilizada para analisar colônias bacterianas com crescimento em qualquer meio de cultura. Ágar sangue é descrito como um dos meios de cultura comumente utilizado, porém um estudo sugeriu que colônias com crescimento em meios cromogênicos também podem ser identificadas por MALDI-TOF MS (LUTHJE *et al.*, 2017).

A partir de um estudo realizado comparando três testes de diagnósticos, sendo eles, cultura microbiológica, MALDI-TOF e sequenciamento 16S rRNA, analisando amostras de leite de mastite, foi possível afirmar que a utilização de técnicas como o MALDI-TOF é de excelência no diagnóstico em nível de espécie dos agentes causadores de mastite (WILSON *et al.*, 2018). O uso do MALDI-TOF MS como método de diagnóstico de agentes causadores de mastite apresentou bons resultados relacionados à rapidez e eficiência da técnica, assim como tem baixos custos com materiais de laboratório e mão de obra especializada. Sendo possível identificar os agentes mais comuns associados à mastite, assim como seu banco de dados pode ser constantemente expandido e atualizado, ampliando as possibilidades de diagnóstico (NONNEMANN *et al.*, 2019).

Um estudo realizado para comparar um protocolo de extração padrão de MALDI-TOF MS vs. protocolo de extração em placa de MALDI-TOF MS, no intuito de saber se a extração em placa pode ser utilizada na identificação de agentes causadores de mastite, assim como o protocolo de extração padrão. Foram utilizados 186 isolados bacterianos criopreservados, originados de quartos mamários de vacas leiteiras com MSC. A partir de um isolamento

preliminar em cultura microbiológica convencional em meio de cultura ágar sangue, foram selecionados isolados de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., e outras bactérias semelhantes a *Streptococcus* (*Aerococcus* spp. e *Lactococcus* spp.). Foi possível a partir da comparação dos dois métodos observar que o protocolo de extração em placa identificou corretamente 167/186 isolados. A identificação a partir de gênero e espécie foi semelhante para ambos os métodos, a partir da comparação, foi possível observar no protocolo de extração em placa, identificação de 68/68 *Staphylococcus aureus* (100%), 45/50 *Streptococcus uberis* (90%), 23/29 *Streptococcus* spp. (79,3%). Por fim, foi possível observar que o protocolo de extração em placa mostrou ter percentual de identificação semelhante ao protocolo padrão do MALDI TOF-MS, e assim é um método alternativo ao método de cultura microbiológica convencional (BARCELOS *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 4102020419). O estudo foi dividido em dois experimentos:

1) Avaliação de biplaca de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite. No período de junho de 2018 a fevereiro de 2019, 1181 amostras de leite foram avaliadas, das quais 476 de vacas com MC e 660 de vacas com MSC. Todas as amostras foram submetidas à identificação de microrganismos pela biplaca com meios de cultura cromogênicos (GP e GN) e pela metodologia padrão.

2) Avaliação de triplaca de meios de cultura cromogênicos (Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil), para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite. No período de junho a outubro de 2019, foram selecionadas 976 amostras de leite de vacas com mastite, das quais 476 de MC e 500 de MSC. Todas as amostras foram analisadas por metodologia padrão e pela triplaca com meios de cultura cromogênicos.

3.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS

A seleção das amostras de leite utilizadas em ambos experimentos (1 e 2) foi feita de forma aleatória, a partir do conjunto de amostras de leite de vacas com MC e MSC enviadas para análise microbiológica no Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite, Qualileite

(FMVZ/USP). As amostras de leite foram coletadas pelos colaboradores das fazendas que enviaram as amostras para análise, essas amostras chegaram ao laboratório congeladas e foram mantidas em -20°C até serem inoculadas nos meios de cultura. Os casos de mastite clínica e mastite subclínica foram identificados de acordo com os critérios utilizados por cada fazenda, de forma independente.

3.2 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DE BIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE

O período de coletas e de análises microbiológicas totalizou 8 meses (de junho/2018 a fevereiro/2019). Foram analisadas 476 amostras de leite de quartos mamários individuais de vacas com MC, coletadas em dezesseis rebanhos leiteiros localizados nos estados de São Paulo e Minas Gerais e 660 amostras compostas (de mais de um quarto mamário) de leite de vacas com MSC, originadas de dois rebanhos leiteiros.

3.2.1 Avaliação da biplaca de meios de cultura cromogênicos

Foram avaliados dois meios de cultura cromogênicos, sendo o primeiro seletivo para bactérias Gram-positivas (Mastitis GP, CHROMagar, França) e o segundo seletivo para bactérias Gram-negativas (Mastitis GN, CHROMagar, França). Os meios de cultura cromogênicos seletivos GP e GN foram aplicados em placas de Petri bipartidas (biplacas), sendo os resultados de identificação microbiológica realizados com base na avaliação visual das características de coloração das colônias, de acordo com a indicação do fabricante.

O meio de cultura cromogênico GP é seletivo para o crescimento de microrganismos Gram-positivos com base nas seguintes colorações das colônias: a) azul escuro/metálico – *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. b) azul turquesa – *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*; c) rosada/rosa – *Staphylococcus aureus*. O meio de cultura cromogênico GN, seletivo para o crescimento de microrganismos Gram-negativos, Levedura e *Prototheca* spp., foi avaliado com base nas seguintes colorações das colônias: a) roxa – *Escherichia coli*; b) azul metálica – *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp./*Serratia* spp.; c) amarela/creme/translúcida – *Pseudomonas* spp.; d) branca e seca – Levedura/*Prototheca* spp.

Em ambos os meios, as colônias com outras cores não descritas anteriormente foram classificadas como outros organismos GP ou GN.

As amostras de leite selecionadas foram inoculadas nos meios de cultura com auxílio de suabe estéril, em capela de fluxo laminar. Após inoculação, as biplacas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas.

A leitura visual dos meios cromogênicos foi realizada após o período de incubação, dentro da capela de fluxo laminar com auxílio de fundo branco para contagem e diferenciação da coloração das colônias microbianas. Todas as avaliações das colorações das colônias foram realizadas por um único pesquisador, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo que os resultados de crescimento das colônias foram registrados em imagens por câmera digital.

3.3 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DE TRIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE

O período de coletas de amostras e de análises microbiológicas totalizou 4 meses (de julho/2019 a novembro/2019). Foram utilizadas 476 amostras de leite quartos mamários individuais de vacas com MC, coletadas em doze rebanhos leiteiros localizados nos estados de Paraná, São Paulo e Minas Gerais; e 500 amostras de leite de vacas com MSC, distribuídas em amostras compostas (de mais de um quarto mamário) (n= 449), de quartos mamários individuais (n = 51).

3.3.1 Avaliação da triplaca de meios de cultura cromogênicos

Foi avaliada a triplaca com meios de cultura cromogênicos (Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil), composta com os seguintes meios seletivos para: a) *Streptococcus* spp., b) *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp., c) bactérias Gram-negativas.

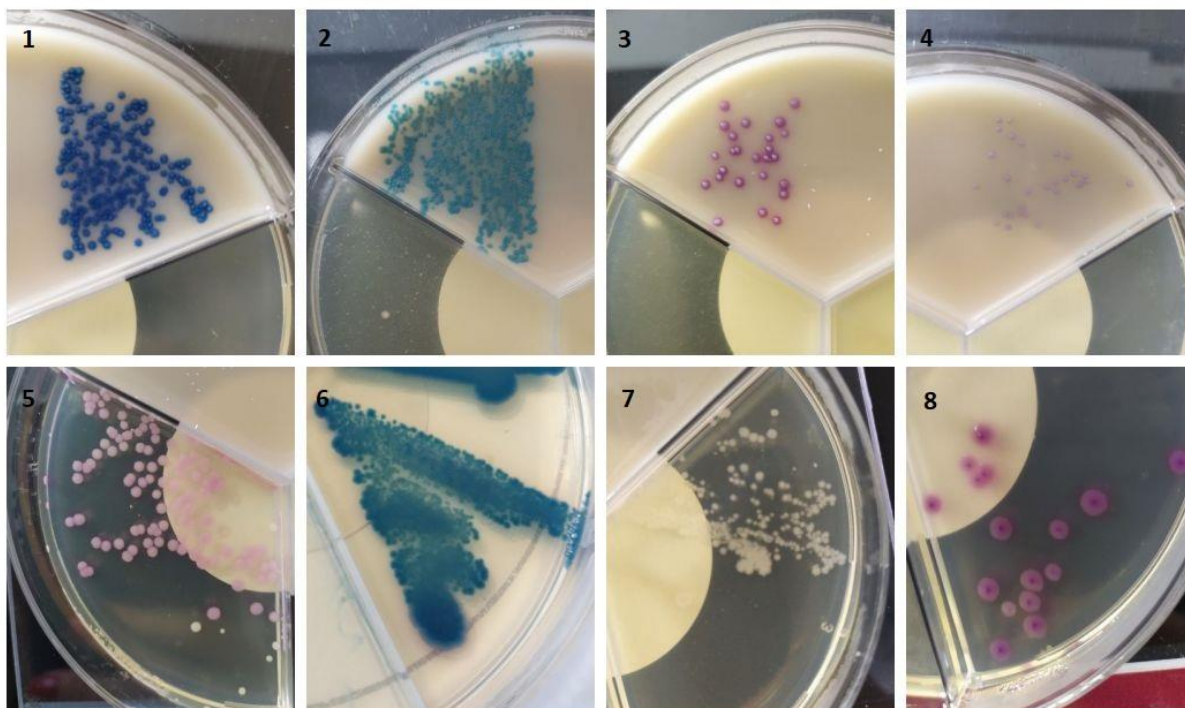
A leitura de resultados do meio de cultura seletivo para *Staphylococcus* foi feita com base nas seguintes colorações das colônias: a) rosa - *Staphylococcus aureus*; b) outras colorações - *Staphylococcus* spp. O meio de cultura seletivo para *Streptococcus* foi avaliado com base nas seguintes colorações das colônias: a) azul escuro - *Streptococcus uberis*; b) azul turquesa - *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*; c) roxo - *Enterococcus* spp.; d) roxo claro (lilás) - *Lactococcus* spp. Por fim, o meio de cultura seletivo para GN foi avaliado

com base nas seguintes colorações de colônias: a) roxa – *Escherichia coli*; b) azul metálica – *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp./*Serratia* spp.; c) amarela – *Pseudomonas* spp.; e) branca e seca – Levedura e *Prototheca* spp. (Figura 1). Quaisquer colônias classificadas com outras cores não descritas anteriormente foram classificadas como outros microrganismos GP ou GN.

As amostras de leite selecionadas foram inoculadas nos meios de cultura com auxílio de suabe estéril, em capela de fluxo laminar. Após inoculação, as triplacas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas.

A leitura visual dos meios cromogênicos foi realizada após o período de incubação, dentro de capela de fluxo laminar com auxílio de fundo branco para diferenciação da coloração das e contagem das colônias microbianas. Todas as avaliações das colorações das colônias foram realizadas por um único pesquisador, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo que os resultados de crescimento das colônias foram registrados em imagens por câmera digital.

Figura 1 - Colorações características de colônias de microrganismos causadores de mastite inoculados em triplaca de meios de cultura cromogênicos: 1 - *Streptococcus uberis*; 2 - *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*; 3 - *Enterococcus* spp.; 4 - *Lactococcus* spp.; 5 - *Staphylococcus aureus*; 6 - *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.; 7 - *Prototheca* spp./Levedura; 8 - *Escherichia coli*.



Fonte: Granja, 2020

3.4 CULTURA MICROBIOLÓGICA

Imediatamente após as inoculações das amostras de leite nos meios de cultura cromogênicos, foi realizada a semeadura em ágar sangue (AS) enriquecido com 5% de sangue bovino, com o uso de suabe estéril. Após inoculação, as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas. Todas as amostras com crescimento microbiano positivo, foram analisadas por Espectrometria de massas MALDI-TOF MS para identificação microbiológica. As amostras com crescimento de >3 colônias com morfologias diferentes foram consideradas contaminadas e não foram analisadas.

3.5 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS)

Após incubação a 37°C por 24 horas das amostras de leite nos meios cromogênicos e no AS, foi selecionada uma colônia, a qual foi aplicada em placa de aço com 96 poços, com auxílio de haste de madeira estéril para extração de proteínas ribossomais. As colônias foram selecionadas de acordo com a coloração, e quando a amostra era composta, uma colônia de cada agente com crescimento positivo foi selecionada e avaliada separadamente. Foi aplicado em cada poço da placa de MALDI-TOF com a colônia, 1,0 µL de ácido fórmico (70%) e após a secagem em temperatura ambiente, foi aplicado 1,0 µL de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em 50% de acetonitrilo e 2,5% de ácido trifluoroacético) e deixado secar novamente em temperatura ambiente. Além das colônias para análise, foi utilizado controle positivo com *Escherichia coli*.

Após os procedimentos de extração, as amostras foram analisadas no equipamento MicroFlex 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) e o processamento dos espectros de massa foi realizado pelo MALDI Biotyper Software 4.1.70 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) para identificação de microrganismos (MBT versão 7311 Biblioteca MPS). Os resultados foram identificados por scores, sendo: $\geq 1,7$ considerados confiáveis para identificação de gênero e $\geq 2,0$ confiáveis para identificação de gênero e espécie (BARCELOS *et al.*, 2019). Quando não identificado o microrganismo em uma primeira leitura por MALDI-TOF MS, o protocolo foi repetido duas vezes.

Para as amostras com identificação presuntiva de *Prototheca* spp. por identificação visual nas placas cromogênicas, foi considerado como metodologia padrão a cultura microbiológica convencional, baseando-se na morfologia das células microbianas, identificando apenas o gênero desse microrganismo.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os indicadores de desempenho diagnóstico [acurácia (Ac), sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de identificação de microrganismos causadores de mastite nos meios cromogênicos em ambos experimentos foram estimados considerando-se a identificação microbiana por MALDI-TOF

MS como metodologia padrão. Amostras com contaminação em um dos dois resultados (AS ou meios de cultura cromogênicos) foram excluídas na análise final dos resultados.

Foram calculados a Ac, Se, Sp, VPP e VPN dos resultados de identificação dos meios cromogênicos, de acordo com: Verdadeiro Positivo (VP; quando houve concordância de resultados do mesmo microrganismo identificado no meio de cultura cromogênico e metodologia padrão), Verdadeiro Negativo (VN; quando não houve crescimento de microrganismos nos meios de cultura cromogênicos e na metodologia padrão), Falso Positivo (FP; quando houve crescimento de algum microrganismo na metodologia padrão diferente do diagnosticado nos meios cromogênicos), Falso Negativo (FN; quando não houve crescimento de microrganismo nos meios cromogênicos e houve crescimento na metodologia padrão) (MACCARRON *et al.*, 2009; ROYSTER *et al.*, 2014; VIORA *et al.*, 2014; GANDA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018). Os resultados de desempenho diagnóstico analisados (Ac, Se, Sp, VPP e VPN) foram classificados como baixos (<60%), intermediários (>60%) e altos (>80%) (ROYSTER *et al.*, 2014). Para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas (FERREIRA *et al.*, 2018):

$$Ac = \frac{(VP + VN)}{N}$$

$$Se = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

$$Sp = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

$$VPP = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

$$VPN = \frac{VN}{(VN + FN)}$$

O coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen foi calculado utilizando o PROC FREQ do SAS (2009). O valor igual a 1 indica 100% de concordância; valores entre 0,81 e 1 foram considerados concordância quase perfeita; de 0,61 a 0,8 coeficiente substancial; de 0,41 a 0,6 indicam moderada concordância e valores entre 0,21 a 0,4 indicam teste falho (FERREIRA *et al.*, 2018).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DE BIPLACA DE MEIOS CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

4.1.1 Prevalência de microrganismos causadores de mastite

4.1.1.2 Mastite Clínica

Do total de amostras de MC, houve crescimento de 53,6% (255/476) de colônias com uma morfologia, 2,7% (13/476) com duas morfologias, 4% (19/476) apresentaram contaminação e 39,7% (189/476) não apresentaram crescimento. A prevalência de agentes entre as bactérias Gram-positivas 27,9% (113/476) foi de *Streptococcus uberis* 6,5% (31/133), *Streptococcus dysgalactiae* 6,5% (31/133), *Staphylococcus chromogenes* 2,9% (14/133), *Staphylococcus aureus* 2,9% (14/133), *Streptococcus agalactiae* 2,9% (14/133), *Staphylococcus* não-aureus 2,1% (10/133) e outros Gram-positivos 4,0 (19/133). Entre as bactérias Gram-negativas 23,5% (112/476), a prevalência foi de *Escherichia coli* 14,7% (70/112), *Klebsiella pneumoniae* 4,8% (23/112), *Serratia marcescens* 1,3% (6/112), *Enterobacter cloacae* 0,6% (3/112), *Klebsiella oxytoca* 0,6% (3/112), *Klebsiella variicola* 0,4% (2/112) e outros Gram-negativos 1,1% (5/112). Em relação aos outros microrganismos 2,1% (10/476), a prevalência foi de 1,1% (5/10) para *Prototheca*, 0,6% (3/10) para *Candida tropicalis* e 0,4% (2/10) para *Candida krusei* (Tabela 1).

4.1.1.3 Mastite Subclínica

Do total de amostras de MSC, houve crescimento de 31,1% (205/660) de colônias com uma morfologia, 4,5% (30/660) com duas morfologias, 10,3% (68/660) apresentaram contaminação e 54,1% (357/660) não apresentaram crescimento. A prevalência de agentes entre as bactérias Gram-positivas 27,9% (179/660) foi de *Staphylococcus chromogenes* 13,5% (89/179), *Staphylococcus aureus* 6,5% (43/179), outros Gram-positivos 2,7% (18/179), *Staphylococcus* não-aureus 2% (13/179), *Streptococcus uberis* 1,4% (9/179), *Streptococcus agalactiae* 0,9% (6/179), e *Streptococcus dysgalactiae* (0,2% (1/179). Entre as bactérias Gram-

negativas 23,5% (21/476), a prevalência foi de outros Gram-negativos 2,1% (14/21), *Escherichia coli* 0,8% (5/21) e *Serratia marcescens* 0,3% (2/21). Em relação aos outros microrganismos 0,8% (5/476), a prevalência foi de 0,8% (5/5) para *Candida krusei* (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados de cultura microbiológica do leite, confirmadas por MALDI-TOF MS de todas as amostras utilizadas no experimento 1, sendo amostras de MC (n = 476) e MSC (n = 660).

	MC	%	MSC	%	Total	%
Total amostras	476	100	660	100	1136	100
Sem crescimento	189	39,7	357	54,1	546	48,1
Colônias com uma morfologia	255	53,6	205	31,1	460	40,5
Colônias com duas morfologias	13	2,7	30	4,5	43	3,8
Contaminação	19	4	68	10,3	87	7,7
Bactérias Gram-positivas	133	27,9	179	27,1	296	26,1
<i>Streptococcus uberis</i>	31	6,5	9	1,4	40	3,5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	31	6,5	1	0,2	32	2,8
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	14	2,9	89	13,5	103	9,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	2,9	43	6,5	57	5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	14	2,9	6	0,9	20	1,8
Outros <i>Staphylococcus</i> não-aureus	10	2,1	13	2	19	1,7
Outros Gram-positivos	19	4	18	2,7	25	2,2
Bactérias Gram-negativas	112	23,5	21	3,2	121	10,7
<i>Escherichia coli</i>	70	14,7	5	0,8	74	6,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	4,8	0	0	23	2
<i>Serratia marcescens</i>	6	1,3	2	0,3	8	0,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	0,6	0	0	3	0,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0,6	0	0	3	0,3
<i>Klebsiella varicola</i>	2	0,4	0	0	2	0,2
Outros Gram-negativos	5	1,1	14	2,1	8	0,7
Outros Microrganismos	10	2,1	5	0,8	10	0,9
<i>Prototheca</i>	5	1,1	0	0	5	0,4
<i>Candida tropicalis</i>	3	0,6	0	0	3	0,3
<i>Candida krusei</i>	2	0,4	5	0,8	5	0,4

4.1.2 Desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos para identificação de microrganismos causadores de mastite

4.1.2.1 Mastite Clínica

A acurácia dos meios de cultura cromogênicos em amostras de MC foi de 94% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*), 95% (*Streptococcus uberis/Enterococcus spp.*), 95% (*Escherichia coli*), 97% (*Staphylococcus aureus*), 98% (*Klebsiella/Enterobacter*), 99% (*Prototheca/Levedura*) e 100% (*Pseudomonas spp.*). Da mesma forma, a sensibilidade dos meios de cultura cromogênicos foi de 56% (*Staphylococcus aureus*), 73% (*Prototheca/Levedura*), 75% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*), 85% (*Klebsiella spp. /Serratia spp.*), 90% (*Escherichia coli*) e 100% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 100% (*Pseudomonas spp.*). A especificidade foi de 95% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 96% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 97% (*Escherichia coli*), 99% (*Staphylococcus aureus*), 99% (*Klebsiella spp. /Serratia spp.*) a 100% (*Prototheca spp. / Levedura*), 100% (*Pseudomonas spp.*).

Considerando os resultados de VPP, os valores variaram de 60% (*Streptococcus uberis/Enterococcus spp.*), 64% (*Staphylococcus aureus*), 67% (*Pseudomonas spp.*), 72% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 83% (*Klebsiella spp. /Serratia spp.*), 84% (*Escherichia coli*) a 100% (*Prototheca spp. / Levedura*). Por fim, os resultados de VPN foram de 97% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 98% (*Staphylococcus aureus*), 98% (*Escherichia coli*), 99% (*Klebsiella spp. /Serratia spp.*), a 100% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 100% (*Pseudomonas spp.*) (Tabela 2).

4.1.2.2 Mastite Subclínica

Para as amostras de MSC, a acurácia dos meios de cultura cromogênicos avaliados foi de 94% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 95% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 98% (*Staphylococcus aureus*), 98% (*Escherichia coli*) e 99% (*Prototheca/Levedura*). A sensibilidade dos meios de cultura cromogênicos foi de 20% (*Prototheca/Levedura*), 67% (*Escherichia coli*), 72% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*), 92% (*Staphylococcus aureus*), e 94% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*). A especificidade foi de 95% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 96% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 98% (*Escherichia coli*) a 99% (*Staphylococcus aureus*).

Considerando os resultados de valor preditivo positivo (VPP), os valores variaram de 31% (*Escherichia coli*), 36% (*Streptococcus uberis / Enterococcus spp.*), 53% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 87% (*Staphylococcus aureus*) a 100% (*Prototheca/Levedura*). Por

fim, os resultados de valor preditivo negativo (VPN) foram de 99% (*Staphylococcus aureus*) a 100% (*Escherichia coli*), 100% (*Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae*), 100% (*Streptococcus uberis* / *Enterococcus* spp.) (Tabela 3).

4.1.3 Concordância (Coeficiente *Kappa*)

4.1.3.1 Mastite Clínica

A concordância entre os resultados da metodologia padrão e dos meios de cultura cromogênicos (GP e GN) em amostras de leite de vacas com MC variaram de 0.47 a 0.84, sendo observada concordância quase perfeita para *Escherichia coli* ($k = 0.8474$) e Levedura/*Prototheca* ($k = 0.80$), concordância substancial para *Streptococcus uberis* ($k = 0.67$) e *Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae* ($k = 0.67$), concordância moderada para *Staphylococcus aureus* ($k = 0.47$) e *Pseudomonas* spp. ($k = 0.44$) (Tabela 2).

4.1.3.2 Mastite Subclínica

Para as amostras de MSC, houve concordância quase perfeita entre as metodologias avaliadas em relação aos resultados de identificação de *Staphylococcus aureus* ($k = 0.88$), enquanto *Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae* apresentaram concordância substancial ($k = 0.68$), e os demais agentes apresentaram teste concordância falha, *Escherichia coli* ($k = 0.18$), *Prototheca*/Levedura ($k = 0.33$), *Streptococcus uberis* ($k = 0.35$). Não foram calculados o coeficiente *Kappa* de isolamento de *Klebsiella* spp./*Serratia* spp., visto que o crescimento bacteriano foi ausente, assim como para *Pseudomonas* spp. (Tabela 3).

Tabela 2 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de biplaca de meios cromogênicos em amostras de leite de vacas com MC (n=476).

	<i>Strep. agalactiae / dysgalactiae</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>KES</i> ⁴	<i>Prototheca/Levedura</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
n ²	34	35	9	67	29	8	2
Ac, % ³	94 (0,41-2,13)	95	97 (0,26-3,65)	95 (0,38-2,39)	98 (0,28-3,39)	99	100
Se, % ³	72 (0,58-0,83)	100 (0,90-1)	56 (0,33-0,77)	89 (0,80-0,94)	85 (0,70-0,93)	73 (0,43-0,90)	100 (0,34-1)
Sp, % ³	96 (0,95-0,98)	95 (0,92-0,96)	99 (0,97-0,99)	97 (0,94-0,98)	99 (0,97-0,99)	100 (0,99-1)	100 (0,98-0,99)
VPP, % ³	69 (0,41 -1,17)	60 (0,41-0,89)	64 (0,24-1,70)	84 (0,49-1,44)	83 (0,37-1,85)	100	67 (0,09-4,72)
VPN, % ³	97 (0,61-1,54)	100	98 (0,56-1,71)	98 (0,51-1,88)	99 (0,44-2,22)	99 (0,38-2,61)	100
<i>K</i> ³	0,67 (0,56-0,77)	0,67 (0,57-0,78)	0,47 (0,26-0,67)	0,84 (0,78-0,91)	0,74 (0,63-0,85)	0,8 (0,65-0,97)	0,44 (0,03-0,84)
<i>k P</i> -value	0,724	<0,001	0,038	0,371	0,251	0,655	0,0253

¹ Biplaca com meios de cultura cromogênicos seletivos para Gram-positivos e Gram-negativos. ² Total de isolamentos (resultados verdadeiros positivos)

³ valores entre parêntesis: IC = intervalo de confiança 95%, ⁴ Teste de concordância *Kappa* de Cohen; ⁵KES = *Klebsiella spp./Enterobacter spp./Serratia spp.*

Fonte: Granja, 2020

Tabela 3 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de biplaca de meios cromogênicos em amostras de leite de vacas com MSC (n=660).

	<i>Strep. agalactiae / dysgalactiae</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
n ²	8	16	45	4
Ac, % ³	99 (0,11-8,98)	95 (0,12-7,42)	98 (0,27-3,47)	98 (0,16-6,06)
Se, % ³	89 (0,56-0,98)	94 (0,73-0,99)	92 (0,80-0,97)	67 (0,30-0,90)
Sp, % ³	99 (0,97-0,99)	95 (0,93-0,99)	99 (0,97-0,99)	98 (0,97-0,99)
VPP, % ³	53 (0,25-1,15)	36 (0,25-0,53)	87 (0,41-1,85)	31 (0,13-0,72)
VPN, % ³	100 (0,15-6,33)	100 (0,15-6,68)	99 (0,39-2,53)	100 (0,32-3,09)
<i>K</i> ³	0,68(0,49-0,88)	0,35 (0,19-0,50)	0,88 (0,8-0,95)	0,18(0-0,4)
<i>k P</i> -value	0,095	<0,001	0,131	0,225

¹ Biplaca com meios de cultura cromogênicos seletivos para Gram-positivos e Gram-negativos. ² Total de isolamentos (resultados verdadeiros positivos)

³ valores entre parêntesis: IC = intervalo de confiança 95%, ⁴ Teste de concordância *Kappa* de Cohen; ⁵KES = *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp./*Serratia* spp.

Fonte: Granja, 2020

4.2 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DE TRIPLACA DE MEIOS CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

4.2.1 Prevalência de microrganismos causadores de mastite

4.2.1.1 Mastite Clínica

Do total de amostras de MC, houve crescimento de 53,2% (253/476) de colônias com uma morfologia, 4,2% (20/476) com duas morfologias, 2,3% (11/476) apresentaram contaminação e 40,3% (192/476) não apresentaram crescimento. A prevalência de agentes entre as bactérias Gram-positivas 8,2% (154/476) foi de *Staphylococcus chromogenes* com 8,2% (39/154), *Staphylococcus aureus* com 5,7% (27/154), outros Gram-positivos com 5,7% (27/154), *Streptococcus uberis* com 3,4% (16/154), *Staphylococcus sciuri* com 2,5% (16/154), *Streptococcus agalactiae* com 2,1% (10/154), *Streptococcus dysgalactiae* com 1,9% (9/154), *Corynebacterium bovis* com 1,7% (8/154) e *Lactococcus garvie* com 1,3% (6/154). Entre as bactérias Gram-negativas 18,5% (88/476), a prevalência foi de *Escherichia coli* com 8,6% (41/88), *Klebsiella pneumoniae* com 4,8% (23/88), *Serratia marcescens* com 2,1% (10/88), outros Gram-negativos com 1,7% (8/88), *Enterobacter cloacae* com 0,6% (3/88) e *Klebsiella oxytoca* com 0,6% (3/88). Em relação à outros microrganismos 2,3% (11/476), a prevalência foi de 1,1% (5/11) para *Candida rugosa*, outras leveduras com 0,8% (4/11) e *Candida tropicalis* com 0,4% (2/11) (Tabela 4).

4.1.1.2 Mastite Subclínica

Do total de amostras de MSC, houve crescimento de 60,2% (301/500) de colônias com uma morfologia, 7,4% (37/500) com duas morfologias, 1% (5/500) apresentaram contaminação e 31,4% (157/500) não apresentaram crescimento. A prevalência de agentes entre as bactérias Gram-positivas 56,2% (281/500) foi de *Staphylococcus chromogenes* com 29,4% (147/281), outros Gram-positivos com 12,6% (63/281), *Staphylococcus aureus* 6,4% (32/281), *Lactococcus garvie* com 3,6% (18/281), *Streptococcus uberis* com 1,4% (7/281), *Streptococcus dysgalactiae* com 1,4% (7/281), *Corynebacterium bovis* com 0,6% (3/281) e *Streptococcus agalactiae* 0,6% (3/281). Entre as bactérias Gram-negativas 4% (20/500), a prevalência foi de outros Gram-negativos com 2,6% (13/20), *Klebsiella pneumoniae* com 0,8% (4/20),

Escherichia coli com 0,2% (1/20), *Enterobacter cloacae* com 0,2% (1/20) e *Klebsiella oxytoca* com 0,2% (1/20) (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados de cultura microbiológica do leite, confirmadas por MALDI-TOF MS de todas as amostras utilizadas no experimento 1, sendo amostras de MC (n = 476) e MSC (n = 500).

	MC	%	MSC	%	Total	%
Total amostras	476	100	500	100	976	100
Sem crescimento	192	40,3	157	31,4	349	35,8
Colônias com uma morfologia	253	53,2	301	60,2	554	56,8
Colônias com duas morfologias	20	4,2	37	7,4	57	5,8
Contaminação	11	2,3	5	1	16	1,6
Bactérias Gram-positivas	154	32,4	281	56,2	435	44,6
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	39	8,2	147	29,4	186	19,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	5,7	32	6,4	59	6
<i>Streptococcus uberis</i>	16	3,4	7	1,4	23	2,4
<i>Staphylococcus sciuri</i>	12	2,5	1	0,2	13	1,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	2,1	3	0,6	13	1,3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	9	1,9	7	1,4	16	1,6
<i>Corynebacterium bovis</i>	8	1,7	3	0,6	11	1,1
<i>Lactococcus garvie</i>	6	1,3	18	3,6	24	2,5
Outros Gram-positivos	27	5,7	63	12,6	90	9,2
Bactérias Gram-negativas	88	18,5	20	4	108	11,1
<i>Escherichia coli</i>	41	8,6	1	0,2	42	4,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	4,8	4	0,8	27	2,8
<i>Serratia marcescens</i>	10	2,1		0	10	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	0,6	1	0,2	4	0,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0,6	1	0,2	4	0,4
Outros Gram-negativos	8	1,7	13	2,6	21	2,2
Outros Microrganismos	11	2,3	0	0	11	1,1
<i>Candida tropicalis</i>	2	0,4	0	0	2	0,2
<i>Candida rugosa</i>	5	1,1	0	0	5	0,5
Outras leveduras	4	0,8	0	0	4	0,4

*Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil.

4.2.2 Desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos

4.2.2.1 Mastite Clínica

A acurácia da triplaca de meios de cultura cromogênicos em amostras de MC foi de 93% (*SNA*), 95% (*Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae*), 95% (*Lactococcus* spp.), 95%

(*Escherichia coli*), 97% (*Enterococcus* spp.), 97% (*Staphylococcus aureus*), 98% (*Serratia* spp.), 98% (*Streptococcus uberis*), 98% (*Klebsiella* spp. / *Enterobacter* spp.), 99% (*Pseudomonas* spp.) e 99% (*Prototheca* spp./Levedura).

Por outro lado, a sensibilidade da triplaca de meios de cultura cromogênicos foi de 18% (*Serratia* spp.), 20% (*Lactococcus* spp.), 43% (*Enterococcus* spp.), 61% (SNA), 75% (*Pseudomonas* spp.), 79% (*Escherichia coli*), 86% (*Staphylococcus aureus*), 86% (*Streptococcus uberis*), 91% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.) e 100% (*Prototheca* spp./Levedura).

A especificidade foi de 95% (*Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae*), 96% (*Lactococcus* spp.), 96% (*Escherichia coli*), 97% (*Staphylococcus aureus*), 97% (SNA), 98% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.), 98% (*Enterococcus* spp.), 99% (*Streptococcus uberis*), 99% (*Prototheca* spp./Levedura), 99% (*Pseudomonas* spp.) e 100% (*Serratia* spp.).

Considerando os resultados de VPP, os valores variaram de 10% (*Lactococcus* spp.), 23% (*Enterococcus* spp.), 43% (*Pseudomonas* spp.), 45% (*Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae*), 67% (*Staphylococcus aureus*), 67% (*Prototheca* spp./Levedura), 68% (*Escherichia coli*), 70% (SNA), 78% (*Streptococcus uberis*) e 79% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.). Por fim, os resultados de VPN variaram de 96% (SNA), 98% (*Escherichia coli*), 98% (*Lactococcus* spp.), 98% (*Enterococcus* spp.), 98% (*Serratia* spp.), 99% (*Staphylococcus aureus*), 99% (*Streptococcus agalactiae* / *dysgalactiae*), 99% (*Streptococcus uberis*), 99% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.) a 100% (*Pseudomonas* spp.), 100% (*Prototheca* spp./Levedura) (Tabela 5 e 6).

4.2.2.2 Mastite Subclínica

A acurácia da triplaca de meios de cultura cromogênicos em amostras de leite de vacas com MSC foi de 87% (SNA), 92% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*), 95% (*Lactococcus* spp.), 96% (*Staphylococcus aureus*), 97% (*Enterococcus* spp.), 98% (*Streptococcus uberis*), 98% (*Klebsiella* spp. / *Enterobacter* spp.), 99% (*Escherichia coli*) e 100% (*Pseudomonas* spp.).

A sensibilidade da triplaca de meios de cultura cromogênicos foi de 24% (*Lactococcus* spp.), 50% (*Pseudomonas* spp.), 50% (*Enterococcus* spp.), 67% (*Streptococcus uberis*), 71% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.), 75% (SNA), 83% (*Staphylococcus aureus*) a 100% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*), 100% (*Escherichia coli*).

A especificidade foi de 94% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 95% (SNA), 98% (*Enterococcus spp.*), 98% (*Staphylococcus aureus*), 99% (*Streptococcus uberis*), 99% (*Escherichia coli*), 99% (*Klebsiella spp./Enterobacter spp.*) a 100% (*Lactococcus spp.*), 100% (*Pseudomonas spp.*).

Considerando os resultados de VPP, os valores variaram de 14% (*Escherichia coli*), 28% (*Streptococcus agalactiae / dysgalactiae*), 29% (*Enterococcus spp.*), 45% (*Klebsiella spp./Enterobacter spp.*), 59% (*Streptococcus uberis*), 76% (*Staphylococcus aureus*), 80% (*Lactococcus spp.*), 89% (SNA) e 100% (*Pseudomonas spp.*). Por fim, os resultados de VPN foram de 87% (SNA), 95% (*Lactococcus spp.*), 98% (*Staphylococcus aureus*), 99% (*Streptococcus uberis*), 99% (*Enterococcus spp.*) a 100% (*Klebsiella spp./Enterobacter spp.*), 99% (*Escherichia coli*), a 100% (*Pseudomonas spp.*) e 100% (*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*) (Tabela 7 e 8).

4.2.3 Concordância (Coeficiente *Kappa*)

4.2.3.1 Mastite Clínica

Para as amostras de MC, a concordância entre os resultados das metodologias variou de 0,07 a 0,85. Foi observada concordância de resultados quase perfeita para *Klebsiella spp./Enterobacter spp.* ($k = 0,85$), concordância substancial para *Escherichia coli* ($k = 0,69$), *Staphylococcus aureus* ($k = 0,70$), *Staphylococcus não-aureus* ($k = 0,71$), *Streptococcus uberis* ($k = 0,75$) e *Levedura/Prototheca spp.* ($k = 0,78$), concordância moderada para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* ($k = 0,53$), *Pseudomonas spp.* ($k = 0,60$) e foi considerado teste falho para *Enterococcus spp.* ($k = 0,12$), *Lactococcus spp.* ($k = 0,12$), *Serratia spp.* ($k = 0,07$) (Tabela 5 e 6).

4.2.3.1 Mastite Subclínica

A concordância de resultados entre a metodologia padrão e a triplaca de meios de cultura cromogênicos para as amostras de MSC variou de 0.33 a 0.72. Foi observada concordância moderada para *Streptococcus uberis* ($k = 0.49$), *Klebsiella spp./Enterobacter spp.* ($k = 0.55$), concordância substancial para *Staphylococcus não-aureus* ($k = 0.62$), *Pseudomonas spp.* ($k = 0.66$) e *Staphylococcus aureus* ($k = 0.72$) e considerado teste falho para *Enterococcus spp.* ($k =$

0.33), *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* ($k = 0.33$), *Lactococcus* spp. ($k = 0.36$), *Escherichia coli* ($k = 0.28$) (Tabela 7 e 8).

Tabela 5 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de triplaca de meios cromogênicos* em amostras de leite de vacas com MC (n = 476)

	<i>Strep. agalactiae / dysgalactiae</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Staph. aureus</i>	SNA ⁴	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>
n ²	19	18	24	30	13	2
Ac, % ³	95 (0,26-3,42)	98 (0,21-4,43)	97 (0,29-3,22)	93 (0,42-2,06)	97 (0,19-4,91)	95 (0,18-4,77)
Se, % ³	86 (0,66-0,95)	86 (0,65-0,95)	86 (0,68-0,94)	61 (0,47-0,73)	43 (0,15-0,74)	20 (0,05-0,50)
Sp, % ³	95 (0,92-0,96)	99 (0,97-0,99)	97 (0,95-0,98)	97 (0,95-0,98)	98 (0,96-0,99)	96 (0,94-0,97)
VPP, % ³	45 (0,29-0,69)	78 (0,32-1,90)	67 (0,37-1,18)	70 (0,39-1,24)	23 (0,08-0,66)	10 (0,02-0,37)
VPN, % ³	99 (0,34-2,84)	99 (0,34-2,83)	99 (0,4-2,45)	96 (0,67-1,36)	99 (0,52-1,88)	98 (0,72-1,34)
<i>K</i> ³	0,53 (0,39-0,68)	0,75(0,61-0,89)	0,70 (0,58-0,82)	0,71 (0,61-0,80)	0,12(0-0,3)	0,12(0-0,29)
<i>k P</i> -value	<0,001	0,1317	0,371	<0,001	0,0007	0,1025

¹ Triplaca com meios de cultura cromogênicos (Streptococcus/ Staphylococcus/ Gram-negativo)

² total de verdadeiros positivos; ³ IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen

⁴ *Staphylococcus* não-aureus; *Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil.

Fonte: Granja, 2020

Tabela 6 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de triplaca de meios cromogênicos* em amostras de leite de vacas com MC (n = 476)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>KE</i> ⁴	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Serratia spp.</i>	<i>Prototheca/Levedura</i>
n ²	34	30	3	2	8
Ac, % ³	95 (0,39-2,30)	98 (0,25-3,87)	99 (0,08-11,67)	98	99
Se, % ³	79 (0,65-0,88)	91 (0,76-0,97)	75 (0,30-0,95)	18 (0,05-0,47)	100 (0,67-1)
Sp, % ³	96 (0,94-0,97)	98 (0,96-0,99)	99 (0,98-1)	100 (0,99-1)	99 (0,98-1)
VPP, % ³	68 (0,41-1,12)	79 (0,39-1,58)	43 (0,14-1,32)	100	67 (0,25-1,79)
VPN, % ³	98 (0,54-1,75)	99 (0,33-2,92)	100 (0,18-5,44)	98 (0,74-1,29)	100
<i>K</i> ³	0,69(0,6-0,8)	0,85(0,75-0,94)	0,6(0,23-0,95)	0,07(0-0,24)	0,78(0,59-0,97)
<i>k P-value</i>	0,079	0,317	0,317	0,025	0,654

¹ Triplaca com meios de cultura cromogênicos (Streptococcus/ Staphylococcus/ Gram-negativo)

² Número de verdadeiros positivos

³ IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen

⁴ KE = *Klebsiella spp./ Enterobacter spp.* *Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil.

Fonte: Granja, 2020

Tabela 7 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de triplaca de meios de cultura cromogênicos* em amostras de leite de vaca com MSC (n =500)

	<i>Strep. agalactiae / dysgalactiae</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Staph. aureus</i>	SNA ⁴	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>
n ²	11	10	35	140	4	8
Ac, % ³	92	98 (0,26-3,60)	99 (0,35-2,64)	87 (0,48-1,57)	97 (0,21-4,45)	95 (0,19-4,69)
Se, % ³	100 (0,74-1)	67 (0,41-0,84)	83 (0,69-0,92)	75 (0,69-0,80)	50 (0,21-0,78)	24 (0,12-0,41)
Sp, % ³	94 (0,91-0,95)	99 (0,97-0,99)	98 (0,96-0,99)	95 (0,91-0,96)	98 (0,96-0,99)	100 (0,98-1)
VPP, % ³	28 (0,19-0,40)	59 (0,26-1,33)	76 (0,41-1,38)	89 (0,56-1,42)	29 (0,11-0,72)	80 (0,17-3,61)
VPN, % ³	100	99 (0,48-2,02)	98 (0,50-1,93)	87 (0,67-1,11)	99 (0,49-1,98)	95 (0,78-1,15)
K ³	0,33(0,18-0,48)	0,49(0,30-0,68)	0,72(0,60-0,82)	0,62(0,55-0,69)	0,33(0,08-0,59)	0,36(0,17-0,54)
<i>k P-value</i>	<0,0001	0,0046	0,2971	0,0008	0,0201	<0,0001

¹ Triplaca com meios de cultura cromogênicos (Streptococcus/ Staphylococcus/ Gram-negativo)

² total de verdadeiros positivos

³ IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen; *Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil.

⁴ *Staphylococcus* não-aureus

Fonte: Granja, 2020

Tabela 8 - Desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade; Se; acurácia, Ac; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e coeficiente de concordância *kappa* de Cohen, *k*) de triplaca de meios de cultura cromogênicos em amostras de leite de vacas com MSC (n= 500).

	<i>Escherichia coli</i>	<i>KE</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
n ²	1	5	1
Ac, % ³	99	98 (0,16-6,11)	100
Se, % ³	100 (0,21-1)	71 (0,36-0,92)	50 (0,15-0,85)
Sp, % ³	99 (0,97-0,99)	99 (0,97-0,99)	100 (0,99-1)
VPP, % ³	14 (0,06-0,31)	45 (0,18-1,14)	100
VPN, % ³	100	100 (0,31-3,21)	100 (0,37-2,65)
<i>K</i> ³	0,28(0-0,72)	0,55(0,27-0,83)	0,66(0,22-1)
<i>k P</i> -value	0,0253	0,1573	0,1573

¹ Triplaca com meios de cultura cromogênicos (Streptococcus/ Staphylococcus/ Gram-negativo)

² total de verdadeiros positivos

³ IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen; *Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil.

⁴ KE = *Klebsiella spp./ Enterobacter spp.*

Fonte: Granja, 2020

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DE BIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

No presente estudo, foi avaliado o desempenho diagnóstico de meios de cultura cromogênicos em amostras de MC e MSC na biplaca, para a identificação rápida dos principais microrganismos causadores de mastite. Os microrganismos com maior prevalência em amostras de MC foram *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* e MSC foram *Staphylococcus aureus* e SNA. Em estudos prévios que também avaliaram métodos de diagnóstico de mastite, resultados similares foram descritos (MCCARRON *et al.*, 2009; GANDA *et al.*, 2016; ROYSTER *et al.*, 2014; VIORA *et al.*, 2014; GRIFFIOEN *et al.*, 2018).

Os resultados de Se do meio de cultura GP variaram de 56-100% para MC e 89-94% para MSC, enquanto para Sp variou de 96-99% para MC e 95-99% para MSC. O uso da biplaca de meios cromogênicos resultou em alta sensibilidade (>90%) e especificidade (>90%) de identificação de *Streptococcus uberis*, tanto para as amostras de MC (100% / 95%) quanto de MSC (94% / 95%). Da mesma forma, a Se de identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* variou de 72% (MC) a 89% (MSC), enquanto a Sp foi de 96% (MC) a 99% (MSC). Por outro lado, os resultados do presente estudo são similares aos descritos para identificação de bactérias do grupo *Streptococcus spp.*, com o uso de triplaca com meio de cultura MKTK, com Se de 92,6% e Sp de 89,5% (MCCARRON *et al.*, 2009). De forma similar, o uso de triplaca Accumast para identificação de *Streptococcus spp.* apresentou Se = 90% e Sp = 93%, no entanto não foi feita a diferenciação das espécies de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (GANDA *et al.*, 2016). Uma das limitações do uso do meio cromogênico GP é a ausência de diferenciação da coloração de colônias de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, uma vez que ambas apresentam coloração similar (azul claro / turquesa), o que implica na necessidade de uso de testes complementares para a diferenciação entre as espécies. No entanto, ainda não há estudos sobre meios de cultura que consigam diferenciar essas bactérias.

Na avaliação do meio cromogênico GP observamos baixa sensibilidade (56%) e VPP (69%) de identificação de *Staphylococcus aureus* nas amostras de MC, no entanto houve baixa prevalência desse patógeno nas amostras avaliadas (9/476). Resultados similares foram

descritos com o uso do kit VetoRapid, cuja sensibilidade foi de 57% e VPP de 54% amostras de MSC (VIORA *et al.*, 2014). No presente estudo, foi observado 1,5% de resultados falso negativos (n=7) para identificação de *Staphylococcus aureus* no meio GP em razão do crescimento de colônias com coloração diferente da indicada (rosa claro). No entanto, nas amostras de MSC, o meio de cultura GP apresentou sensibilidade de 92% para identificação de *Staphylococcus aureus*. De forma similar aos resultados das amostras de MSC, outros estudos sobre meios de cultura cromogênicos seletivos para *Staphylococcus* spp. relataram sensibilidade de 100% e especificidade de 99.8% de identificação de *Staphylococcus aureus* (GANDA *et al.*, 2016). Estudos que avaliaram o crescimento de *Staphylococcus aureus* em Petrifilm relataram sensibilidade de 92.1 e especificidade de 93.1% (MCCARRON *et al.*, 2009).

Em relação ao grupo de bactérias Gram-negativas isoladas em nas amostras de MC, o meio de cultura cromogênico GN apresentou Se que variou foi de 89% (*Escherichia coli*) e a Sp 97% (*Escherichia coli*). Da mesma forma, nas amostras de MSC a identificação de *Escherichia coli* foi de Se = 67% e Sp = 98%. Resultados similares foram descritos para de identificação de *Escherichia coli* com a triplaca Accumast, com Se = 100% e Sp = 96,5%, e para KES de Se = 98% e Sp = 96% (FERREIRA *et al.*, 2018). Por outro lado, resultados inferiores de Se (75%) foram descritos para identificação de *Escherichia coli* em meio de cultura cromogênico GN (Ganda *et al.* 2016). Ainda no presente estudo, nas amostras de MC, a identificação de *Prototheca/Levedura* apresentou Se de 73% e Sp de 100%, sendo que não foram encontrados outros estudos sobre identificação destes agentes em meios de cultura cromogênicos em amostras de mastite bovina.

Os resultados de Ac do meio de cultura GP variaram de 94 a 97% para MC e 95 a 89% para MSC entre os patógenos avaliados. A Ac de identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* foi >94% em ambas as amostras de MC e MSC. Destaca-se que em alguns estudos não houve diferenciação entre espécies de *Streptococcus* spp., o que dificulta a comparação dos valores de Ac com os obtidos no presente estudo. Sendo assim, a Ac de identificação de *Streptococcus* spp. foi de 91,5% (GANDA *et al.*, 2016) e 94 % (FERREIRA *et al.*, 2018) com o uso da triplaca Accumast, enquanto que a Ac foi de 89,8%, para o *Minnesota Easy System* de 93% para os meios Mastitis SSGN Quad plate (DQCI Services, Mounds View, MN) de 89,3% para o meio Mastitis SSGNC Quad plate (DQCI Services, Mounds View, MN) (FERREIRA *et al.*, 2018). Comparado-se com outros meios de cultura anteriormente citados o meio de cultura GP apresenta resultados similares de Ac, no

entanto ainda foi o único que diferenciou os resultados dos grupos de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*.

A Ac de identificação de *Staphylococcus aureus* no meio de cultura GP variou de 97% nas amostras de MC a 98% para amostras de MSC, o que sugere desempenho ligeiramente inferior ao descrito por Ganda *et al.* (2016), que relataram Ac de 99.8% com o uso da triplaca Accumast. De forma similar, a Ac de identificação de bactérias Gram-negativas no meio GN em amostras de MC variou de 95-100% e para as amostras de MSC variou de 98-100%. Em relação a identificação de *Escherichia coli*, a Ac média foi de 96,5%, cujo resultado foi acima ao descrito na avaliação do meio de cultura Accumast (95,7%) (GANDA *et al.*, 2016) e 90% para o método Mastitis SSGN Quad plate (DQCI Services, Mounds View, MN) (FERREIRA *et al.*, 2018). Em relação a identificação de bactérias do grupo KES, o meio de cultura GN apresentou Ac de 98% em amostras de MC, similar ao relatado por Ganda *et al.* (2016) com 97,5%. Destaca-se que outros estudos sobre a avaliação de meios de cultura seletivos para bactérias Gram-negativas não houve a diferenciação de espécies ou grupos, classificando os resultados como ausência/presença de coliformes.

Os resultados de VPP variaram de 60-69% nas amostras de MC e 36-87% para as amostras de MSC, enquanto os resultados de VPN foram $\geq 97\%$ nas amostras de MC e MSC. O VPP variou em relação do tipo de microrganismo, sendo menor para identificação de *Staphylococcus aureus* (64%) e *Streptococcus uberis* (60%) em amostras de MC, enquanto que nas amostras de MSC, o VPP de identificação de *Streptococcus uberis* foi de 36% e para *Escherichia coli* de 31%. Os resultados de VPP obtidos no presente estudo foram menores comparados aos descritos com o uso do kit VetoRapid, cujos VPP para identificação de *Streptococcus uberis* foi 48%, para *Staphylococcus aureus* 52% e para *Escherichia coli* 72% (VIORA *et al.*, 2014). Da mesma forma, outros estudos observaram resultados semelhantes ao de Viora *et al.* (2014), como os descritos para *Escherichia coli* com 79% (GANDA *et al.*, 2016), *Staphylococcus aureus* com 49,3% (MCCARRON *et al.*, 2009), *Escherichia coli* com o uso de meio de cultura Accumast com 76,5% e no meio SSGNC com 55% (FERREIRA *et al.*, 2018). Essa diferença nos resultados de VPP quando comparados a outros estudos está associado com a prevalência dos agentes nas amostras testadas. Os resultados de VPN foram $\geq 97\%$ tanto em amostras de MC quanto de MSC, o que sugere alta capacidade da biplaca de meios cromogênicos de identificar corretamente amostras com resultados negativos.

A concordância de resultados de identificação entre a metodologia padrão e o meio GP foi moderada para *Staphylococcus aureus* ($k = 0.47$) e substancial para *Streptococcus*

uberis/Enterococcus spp. e *Streptococcus agalactiae/ dysgalactiae* ($k = 0.67$) para MC. Por outro lado, a concordância de resultados foi falha para *Streptococcus uberis* ($k = 0.35$) e concordância quase perfeita para *Staphylococcus aureus* ($k = 0.88$) nas amostras de MSC. Em estudo recente sobre quatro métodos de diagnóstico rápido na fazenda (CHROMagar Mastitis, Hardy Diagnostics Mastitis Triplate, Minnesota Easy Culture S-II Tri-plate e VétoRapid), foi observado concordância falha entre a cultura microbiológica padrão com os meios e cultura cromogênicos CHROMagar, principalmente para o bactérias Gram-positivas ($k = 0.23$; $>0.20-0.40$) (GRIFFIOEN *et al.*, 2018). Para *Staphylococcus aureus* os valores de *Kappa* no meio GP para MSC ($k = 0.88$) foram similares aos descritos no meio Accumast (GANDA *et al.*, 2016), que apresentou concordância quase perfeita de $k = 0.93$ com a metodologia padrão.

Para a identificação de bactérias Gram-negativas em amostras de MC, os resultados de concordância do meio GN e da metodologia padrão foram de $k \geq 0.8$, sendo para *Escherichia coli* ($k = 0.84$) e Levedura/*Prototheca* ($k = 0.8$), o que indica concordância quase perfeita entre as metodologias avaliadas. Este elevado valor de concordância foi similar aos resultados descritos com o meio de cultura Accumast, com concordância de $k = 0.81$ para bactérias Gram-negativas (FERREIRA *et al.*, 2018).

Nossos resultados sugerem que os meios de cultura cromogênicos avaliados (GP e GN) são eficientes no diagnóstico presuntivo visual dos patógenos causadores de mastite. Visto que, a acurácia média nas amostras de MC e MSC foi $\geq 87\%$, o que indica adequado desempenho destes meios de cultura para diagnóstico rápido (18 a 24 hs) dos principais microrganismos causadores de mastite. Os resultados de identificação de microrganismos causadores de mastite foram baseados na incubação dos meios de cultura cromogênicos por 24h, de acordo com recomendação do fabricante pois pode ocorrer alteração da coloração características em tempos de incubação mais prologados. No entanto, o uso do meio de cultura GP apresenta limitações de identificação de *Staphylococcus aureus*, em razão da variação de coloração das colônias destes microrganismos.

5.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DE TRIPLACAS DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

No presente estudo, foi avaliado o desempenho diagnóstico de meios de cultura cromogênicos em amostras de MC e MSC na triplaca, para a identificação rápida dos principais

microrganismos causadores de mastite. Os microrganismos com maior prevalência em amostras de MC foram SNA, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e MSC foram *Staphylococcus aureus* e SNA. Estudos prévios também identificaram alta prevalência de *Staphylococcus aureus* em amostras de mastite clínica e subclínica, com o uso de meios de cultura de identificação rápida (VIORA et al., 2014; GRIFFIOEN et al., 2018). Com o uso de biplaca e triplaca do sistema *Minnesota Easy Culture* foi observada alta prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus*, assim como *Klebsiella* spp. em amostras de mastite clínica e subclínica (ROYSTER et al., 2014).

Os resultados de Se da triplaca de meios cromogênicos para identificação de *Streptococcus* spp. variaram de 86% em amostras de MC e 67-100% em MSC, enquanto a Sp variou de 95-99% para MC e de 94-98% para MSC. Para as amostras de MC a Se e Sp para identificação de *Streptococcus uberis* (86% / 99%) e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* (86% / 95%) foram similares. O uso do kit de diagnóstico VetoRapid (VIORA et al., 2014) para identificação de *Streptococcus uberis* resultou em Se de 84% e Sp de 92%, o que foi similar ao observado em nosso estudo. Outros estudos avaliaram o desempenho de meios de cultura para identificação de *Streptococcus* spp. sem diferenciação de espécies, sendo descritas para a triplaca Accumast Se = 90% e Sp = 92,9% (GANDA et al., 2016) e Se = 100% e Sp = 93% (FERREIRA et al., 2018). Para a identificação de *Enterococcus* spp. a Se variou de 43% (MC) a 50% (MSC) e a Sp foi 98% para MC e MSC. De maneira similar, a identificação de *Lactococcus* spp. apresentou Se com variação de 20% (MC) a 24 (MSC) e Sp 96% (MC) e 100% (MSC). O uso da triplaca Accumast para identificação de *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. resultou em Se = 87,5% e Sp = 94,8% (FERREIRA et al., 2018). Por outro lado, a avaliação do kit VetoRapid para identificação de *Enterococcus* spp. resultou em Se inferior (17%) e Sp similar (93%) (VIORA et al., 2014). Como limitação do diagnóstico visual de *Lactococcus* spp., foi observada variação de coloração das colônias de acordo com a espécie (*Lactococcus garviae* e *Lactococcus lactis*), cuja coloração característica é roxa clara (lilás) no meio de cultura seletivo para *Streptococcus* spp. Foram observados resultados FN (n=8 para MC / n= 25 para MSC) para *Lactococcus* spp. pois isolados de *Lactococcus garviae* apresentaram crescimento com coloração branca ou translúcida, tanto em amostras de MC quanto de MSC. Um estudo recente comparou quatro diferentes meios de cultura e também descreveu a ocorrência de resultados FN em relação a diagnóstico de *Lactococcus* spp. com o uso da triplaca do *Minnesota Easy System* (FERREIRA et al., 2018). Essa limitação da variação

de coloração das colônias afetou negativamente os resultados de Se de identificação de *Lactococcus* spp. no presente estudo.

Os resultados de Se e Sp do meio cromogênico seletivo para *Staphylococcus* spp. variaram de acordo como tipo de amostra de MC e MSC. A Se para identificação de *Staphylococcus aureus* foi de 86% (MC) e 83% (MSC), enquanto a Se de identificação de SNA foi de 61% (MC) e 75% (MSC). Tanto para a MC quanto MSC, a Sp >97% para identificação de *Staphylococcus aureus* e >95% para SNA. Os resultados de Se de identificação de *Staphylococcus aureus* do presente estudo foram inferiores aos descritos pelo sistema Minnesota Tri-plate e 3M Petrifilm Staph Express que apresentou Se = 97,4% (MCCARRON et al., 2009) e Accumast com Se = 100% (GANDA et al., 2016); mas superiores ao kit VetoRapid, que apresentou Se = 65% (VIORA et al., 2014). No entanto em relação a Sp, os resultados de identificação de *Staphylococcus aureus* foram superiores aos descritos por outros estudos, como Sp = 94% (VIORA et al., 2014), 76,1% (MCCARRON et al., 2009) ou similares (Sp = 99,8%; GANDA et al., 2016). Para a correta utilização dos resultados de testes rápidos de diagnósticos, é essencial a obtenção de resultados satisfatórios de acurácia, sensibilidade e especificidade de identificação de *Staphylococcus aureus*, diferenciando-o de outras espécies de SNA. Resultados falsos negativos impactam negativamente a aplicação de medidas de manejo como a segregação ou descarte de vacas, além do maior o risco de transmissão entre vacas (ROYSTER et al., 2014). Para a identificação de SNA, a Se foi de 61% e a Sp de 97% nas amostras de MC, assim como nas amostras de MSC, foi observada Se de 75% e Sp de 95%. A identificação de SNA apresenta resultados variáveis em outros estudos, com Se de 78,4% na triplaca Accumast (GANDA et al., 2016), enquanto no kit VetoRapid a Se foi de 24% (VIORA et al., 2014). Por outro lado, a Sp de identificação de SNA foi similar entre os estudos (VIORA et al., 2014; GANDA et al., 2016).

Em relação ao grupo de bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de MC e MSC, o meio de cultura cromogênico GN apresentou Se que variou de 18-91% para amostras de MC e de 50-100% para MSC, por outro lado, a Sp variou de 96-100% para MC e de 99-100% nas amostras de MSC. No presente estudo, a Se de identificação de *Escherichia coli* variou de 79% (MC) a 100% (MSC), enquanto a Sp foi >96%. Foram descritos resultados variáveis de Se e Sp de identificação de *Escherichia coli* em outros estudos. Por exemplo, a tripla Accumast apresentou Se/Sp de 75% / 97,9% (GANDA et al., 2016) e 100% / 96,5% (FERREIRA et al., 2018), enquanto o kit VetoRapid apresentou Se/Sp de 58% / 98% (VIORA et al., 2014) e o meio de cultura SSGNC com 73,3% / 92,4% (FERREIRA et al., 2018).

Para a identificação do grupo *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp., os resultados Se e Sp do presente estudo são similares aos descritos na avaliação da triplaca Accumast (GANDA *et al.*, 2016), com Se = 97,8% e Sp = 96,5%. Em relação aos demais microrganismos Gram-negativos, como *Pseudomonas* spp. foi observou-se baixa Se nas amostra de MSC (50%) o que pode estar associado ao número de FN e o baixo número de amostras (2 / 3). No entanto, nas amostras de MC, a identificação de *Pseudomonas* spp. apresentou Se = 75% e Sp = 99%, o que foi um pouco abaixo dos resultados descritos por Ganda *et al* (2016) com Se = 100 e Sp = 99,8%. No presente estudo, houve baixo número de isolamento de *Serratia* spp., com prevalência de duas cepas para MC e nenhuma para MSC.

Os resultados de Ac da triplaca Smartcolor2 foram >97% para bactérias Gram-negativas e >90% para bactérias Gram-positivas. A identificação de *Staphylococcus aureus* e do grupo *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp. apresentou Ac de 96-98% tanto para as amostras de MC como de MSC, o que foi similar aos resultados obtidos em estudos anteriores (GANDA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018). Da mesma forma, a Ac de identificação de *Escherichia coli* foi 95% para MC e 99% para MSC, cujos resultados são similares ao descrito em outros estudos (GANDA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018).

Em relação aos resultados de VPP os valores variaram de 10-100% para amostras de MC, e de 14-100% para amostras de MSC. Em relação aos resultados de VPN, houve variação de 96-100% em amostras de MC e de 87-100% para amostras de MSC. Foi observado baixos resultados de VPP para a identificação de *Lactococcus* spp. (10%) e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* (45%) em amostras MC, enquanto para as amostras de MSC o VPP de identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* foi de 28% e *Streptococcus uberis* de 59%. Os resultados de VPP de identificação de *Streptococcus uberis* com o kit VetoRapid foram similares ao do presente estudo (VIORA *et al.*, 2016). Para *Staphylococcus aureus* o VPP variou de 67-76% para MC e MSC, respectivamente, o que pode ser considerado similar aos dos estudos prévios, como 49% (MCCARRON *et al.*, 2009), 87,15% (GANDA *et al.*, 2016) e 52% (VIORA *et al.*, 2014). Em relação ao VPN, ocorreu variação de 87-100% entre os microrganismos avaliados em amostras de MC e MSC deste estudo.

Houve variação resultados de concordância *Kappa* entre a identificação pela triplaca de meios de cromogênicos e a metodologia padrão, de acordo com o tipo de patógeno isolado. Para as bactérias Gram-negativas o valor de *Kappa* variou de $k = 0,07$ para *Serratia* spp. em amostras de MC a $k = 0,85$ para *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp. em amostras de MC; e $k = 0,28$ para *Escherichia coli* a $k = 0,66$ para *Pseudomonas* spp. para amostras de MSC, os quais

são resultados similares aos descritos para identificação de *Pseudomonas* spp. nos meios de cultura Accumast, $k = 0,66$ (GANDA *et al.*, 2016). Os maiores valores de *Kappa* avaliados como concordância quase perfeita ($k = 0,8-1,0$) foram observados somente para *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp. nas amostras de MC ($k = 0,85$), diferentemente do que foi encontrado nos resultados de bi e triplaca do Minnesota Easy Culture System o qual variou para ambos métodos de $k = 0,21$ a $0,50$ para grupo de bactérias (ROYSTER *et al.*, 2014).

Para o meio seletivo de *Staphylococcus*, foram observados resultados de concordância que variaram de moderada a substancial para *Staphylococcus aureus*, $k = 0,70$ para MC e $k = 0,72$ para MSC e *Staphylococcus* não aureus, com $k = 0,71$ para MC e $k = 0,62$ para MSC. Estes resultados são inferiores aos descritos por Ganda *et al.* (2016), os quais obtiveram concordância quase perfeita para diagnóstico de *Staphylococcus aureus* ($k = 0,93$), no entanto para *Staphylococcus* não-aureus foi encontrada concordância moderada ($k = 0,52$).

6 CONCLUSÃO

O desempenho diagnóstico da biplaca e triplaca de meios de cultura cromogênicos variou de acordo com o tipo de microrganismos causadores de mastite bovina e com o tipo de amostra (mastite clínica ou subclínica). A acurácia de identificação visual de agentes causadores de mastite com o uso de biplacas e triplacas com meios cromogênicos foi >87%, tanto em amostras de MC, quanto MSC. O uso da triplaca Smartcolor2 possibilita a identificação rápida de agentes causadores de mastite, com Ac para MC e MSC de 97% e 96% (*Staphylococcus aureus*); 93% e 87% (SNA); 98% e 98% (*Streptococcus uberis*); 95% e 92% (*Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*); 95% e 95% (*Lactococcus* spp.); 97% e 97% (*Enterococcus* spp.); 95% e 99% (*Escherichia coli*); 98% e 98% (*Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp.); 98% e 100% (*Serratia* spp.); 99% e 100% (*Pseudomonas* spp.); 99% e 100% (Levedura e *Prototheca* spp.).

O uso de meios de cultura cromogênicos permite a identificação rápida (<24 hs) dos principais agentes causadores de mastite, com base na coloração das colônias microbianas, o que permite rapidez na tomada de decisão de tratamento da mastite e, conseqüentemente, ao uso racional de antibióticos.

7 REFERÊNCIAS

- ADKINS, P.R.F.; MIDDLETON, J.R. Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 34, p.479-491, 2018.
- ANDRADE, L. M. **et al.** Efeitos genéticos e de ambiente sobre a produção de leite e a contagem de células somáticas em vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.2, p.343-349, 2007.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical Animal Health and Production**, v.50, p. 1193-1202, 2018.
- AHRHOLDT, J. **et al.** Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping, **Medical Mycology**, v. 50, n. 3, p. 234-243, 2012
- BARCELOS, M.M.; **et al.** Comparison of standard an on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019.
- BARREIRO, J.R. **et al.** *Short communication:* Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661-5667, 2010.
- BRADLEY, A.J. Bovine Mastitis: An evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 163, p. 1-13, 2002.
- BECKER, K. **et al.** Development and evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 42, n. 11, 2004.
- BERGEN, M.; **et al.** Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. **Proteomics Clinical Applications**, v. 3, n. 7, p. 74-78, 2009.
- BOGNI, C. **et al.** War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens, in A. Méndez-Vilas (ed.), Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances, pp. 483–494, 2011.
- CAMERON, M. **et al.** Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1-10, 2015.
- CAMERON, M. **et al.** Short communication: Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v.101, p. 590-595, 2017.
- DOHOO, I.R. **et al.** Diagnosis intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 250-261, 2011.

- DOWN, P.M. **et al.** Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.145, p.91-99, 2017.
- DUARTE, C.M.; FREITAS, P.P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, p.665-672, 2015.
- DURSO, L.M.; COOK, K.L. One health and antibiotic resistance in agroecosystems. **Eco Health**, 2018.
- FERREIRA, J.C. **et al.** Comparative analysis of four commercial on farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle. **PLOS ONE**. 13(3): e0194211, 2018.
- GALAT, A. **et al.** Novel method based on chromogenic media for discrimination and selective enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk products. **Food Microbiology**, v.55, p. 86-94, 2016.
- GANDA, E.Z. **et al.** Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. **PLOS ONE**. 11(5): e0155314, 2016.
- GOMES, F. HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. **Current microbiology**, v.72, p. 377-382, 2016.
- GONÇALVES, J.L. **et al.** Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*, v. 210, p. 25-32, 2018.
- GRABER, H.U. **et al.** Bovine *Staphylococcus aureus*: Diagnostic properties of specific media. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.38-44, 2013.
- GRIFFIOEN, K. **et al.** Dutch dairy farmers need for microbiological mastitis diagnostics. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1-11, 2016.
- GRIFFIOEN, K. **et al.** Agreement between four commercial diagnostic tests and routine bacteriological culture of milk to determine the udder infections status of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, 2018.
- JAMALI, H. **et al.** Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, V. 101, p. 1-18, 2018.
- KAYITSINGA, J. **et al.** Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1388-1407, 2016.
- KROMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis Treatment – Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.21-29, 2017.

- LAGO, A. **et al.** The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4441–4456, 2011.
- LAGO, A.; GODDEN, S.M. Use of rapid culture systems to guide clinical mastitis treatments decisions. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.34, p.389 – 412, 2018.
- LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.
- LUTHJE, P. **et al.** Identification of microorganisms grown on chromogenic media by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v.136, p.17-20, 2017.
- MACCARRON, J.L. **et al.** Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species from clinically mastitis milk samples. **Journal of Dairy Science**. v.92, p.5326- 5333, 2009.
- MACDOUGALL, S.; NIETHAMMER, J.; GRAHAM, L.E. Antimicrobial usage and risk of retreatment for mild to moderate clinical mastitis cases on dairy farms following on-farm bacterial culture and selective therapy. **New Zealand Veterinary Journal**, v.66:2, p.98-107, 2018.
- MANAFI, M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 205-218, 2000.
- MIGUEL, J.A. **et al.** Evaluation of two commercially available chromogenic media for confirmation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human, animal, and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 209, p. 26-28, 2015.
- National Mastitis Council (NMC). 2017. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council. Madison, WI**, 2017.
- NONNEMANN, B. **et al.** Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1-10, 2019.
- PENRY, J.F. Mastitis control in automatic milking systems. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.34, p. 439-456, 2018.
- PERRY, J.D. A Decade of Development of Chromogenic Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. **Clinical Microbiology Reviews**, v.30, p.449-479, 2017.
- PERRY, J.D.; FREYDIERE, A.M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103(6), p. 2046-55, 2007.
- POIZAT, A. **et al.** Antibiotic use by farmers to control mastitis as influenced by health advice and dairy farming systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 61-72, 2017.
- ROYSTER, E. **et al.** Evaluation of the Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate and Tri-plate for identification of common mastitis pathogens in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 3648-3659, 2014.

ROYSTER, E.; WAGNER, S.; Treatment of Mastitis in Cattle. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 3, p.17–46, 2015.

RUIZ, M.S. **et al.** Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.35, p.303-313, 2017.

SHUKKEN, Y. **et al.** The “other” Gram-negative bacteria in mastitis, *Klebsiella*, *Serratia*, and more. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.28, p. 239-256, 2012.

SINGHAL, N. **et al.** MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, 6:791, 2015.

SORDILLO, L.M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.35, p. 507-523, 2018.

TOMAZI, T. **et al.** Identification of Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. 2014.

TOMAZI, T. **et al.** Association of Herd-Level Risk Factors and Incidence Rate of Clinical Mastitis in 20 Brazilian Dairy Herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.161, p. 9-18, 2018.

VASQUEZ, A.K. **et al.** Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in New York dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p.1-12, 2017.

VIORA, L. **et al.** Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis. **Veterinarian Record**, 2014.

WILSON, D.J. **et al.** Test Agreement among Biochemical Methods, MALDI-TOF and 16S rRNA Sequencing for the Identification of Microorganisms Isolated from Bovine Milk. **Journal of Clinical Microbiology**, 2018.

ZADOKS, R.N; SCHUKKEN, Y.H. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 22, p. 229-261, 2006.

APÊNDICE

ISOLADOS BACTERIANOS E CEPAS BACTERIANAS ATCC

Foram selecionados aleatoriamente 225 isolados bacterianos, sendo 25 isolados de cada agente específico, de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* não aureus, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp. e *Prototheca* spp. Adicionalmente, foram selecionadas as cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 e 21600, *Staphylococcus chromogenes* 43765, *Streptococcus agalactiae* 13813 e *Escherichia coli* 25922. Os isolados bacterianos e as cepas ATCC foram inoculadas em dois meios de cultura cromogênicos seletivos para bactérias Gram-positivas e outro para Gram-negativas (CHROMagar, França) com objetivo de avaliar a variação de coloração das colônias nos meios de cultura cromogênicos. Os isolados bacterianos e de *Prototheca* spp. foram selecionados aleatoriamente da coleção de isolados microbianos do Laboratório de Pesquisa em Qualidade de Leite (QUALILEITE – FMVZ/USP).

Os isolados e as cepas bacterianas ATCC estavam criopreservados a -80°C até a realização das culturas microbiológicas. Após o descongelamento em temperatura ambiente, os isolados e as cepas bacterianas ATCC foram inoculados em meio de cultura AS e incubados em estufa à 37°C por 24 horas. As amostras com crescimento positivo foram submetidas à identificação por técnica de Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS), e posteriormente, inoculadas nos meios de cultura cromogênicos (GP e GN).

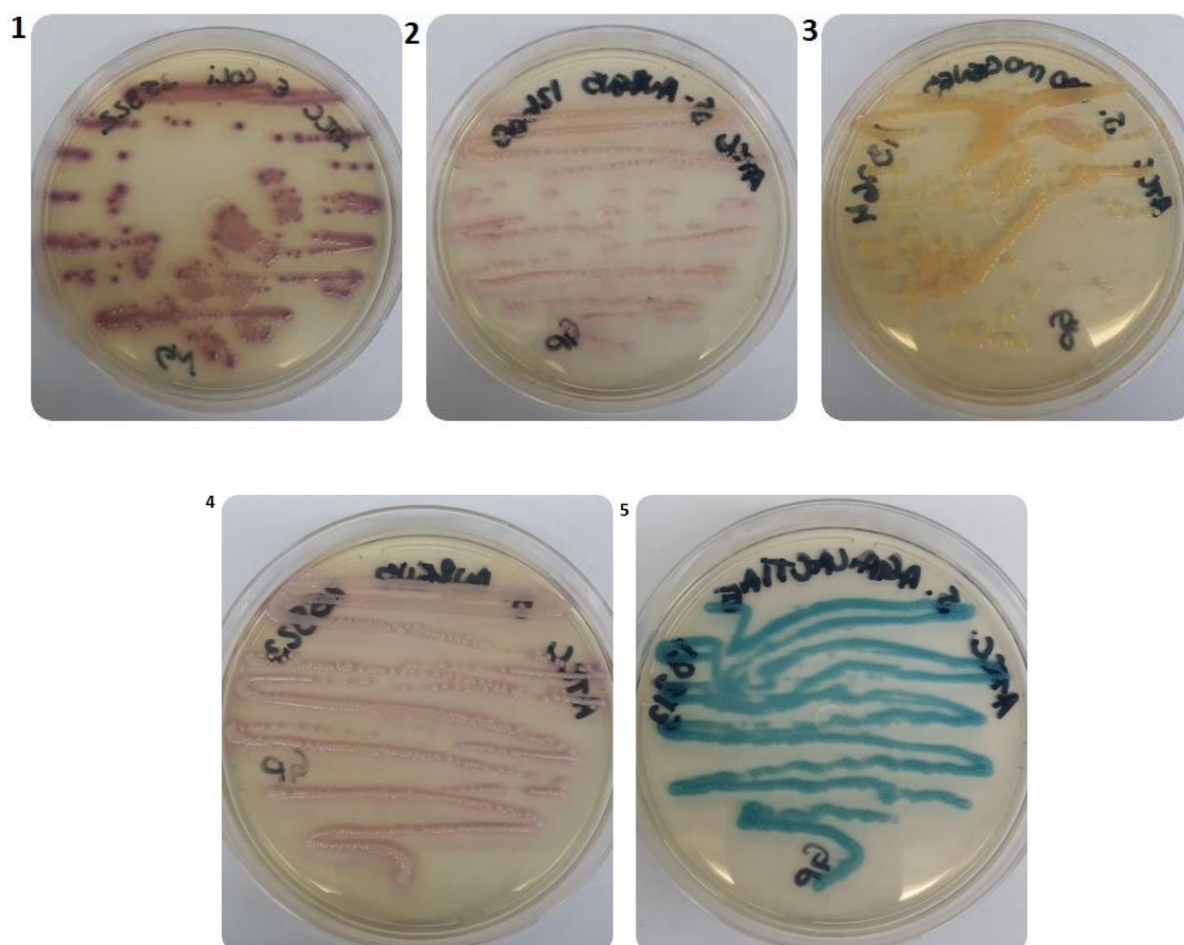
Para inoculação nos meios de cultura cromogênicos (GP e GN), as colônias dos isolados microbianos foram diluídas em 10 mL de solução salina estéril (0,9% de NaCl), inoculadas com o uso de alças descartáveis nas placas com meios cromogênicos e incubados em estufa a 37°C, por 24 horas. Após a incubação as placas foram avaliadas de acordo com a coloração específica para cada agente e registradas em imagens por câmera digital.

Após inoculação e período de incubação como citado anteriormente, as cepas ATCC e isolados microbiológicos apresentaram a coloração similar ao recomendado pelo fabricante.

Todas as amostras apresentaram coloração de acordo com o que é indicado pelo fabricante. Os diferentes isolados de *Staphylococcus* não aureus variam sua coloração, apresentando desde branco/creme, rosada até tons de azul, no entanto não interferindo na coloração de *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, como o meio GP também identifica como azul *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. (azul escuro / metálico) e *Streptococcus*

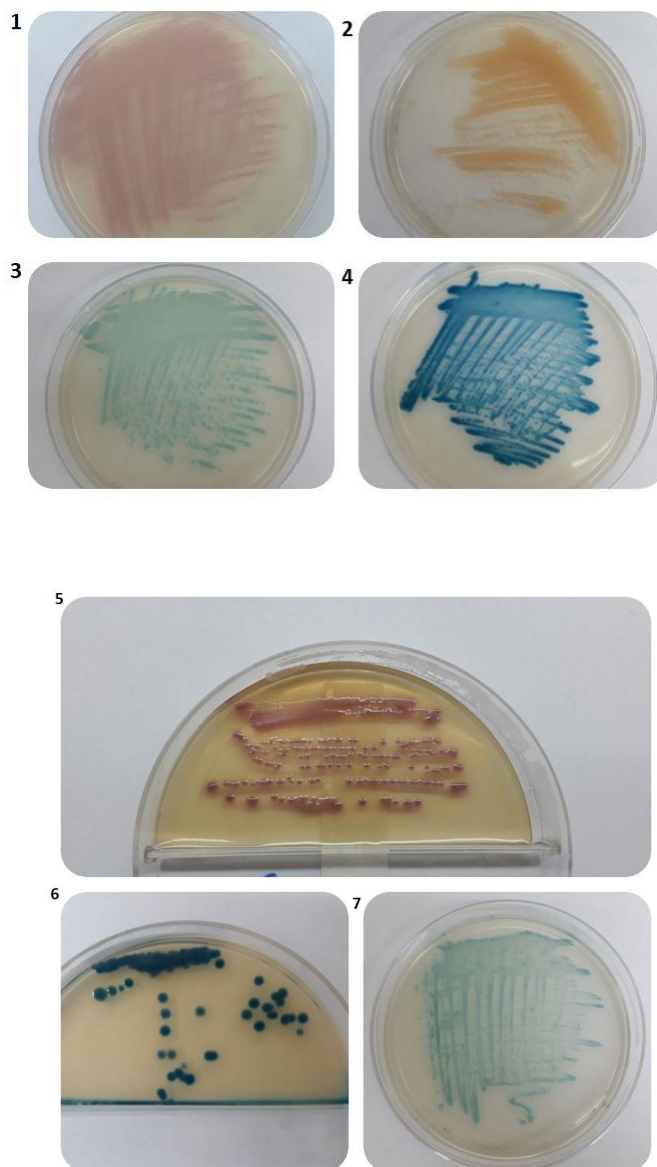
agalactiae/dysgalactiae (azul claro/turquesa), pode gerar dúvidas no diagnóstico e possíveis FP, pois alguns *Staphylococcus* não aureus, como *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus sciuri* podem apresentar coloração semelhante. Nas demais cepas e isolados inoculados nos meios de cultura cromogênicos GP e GN não apresentaram variação de coloração.

Figura 2 – Colorações características de colônias de cepas ATCC inoculadas em biplaca de meios de cultura cromogênicos (GP/GN): 1. *Escherichia coli* 25922; 2. *Staphylococcus aureus* 21600; 3. *Staphylococcus chromogenes* 43765; 4. *Staphylococcus aureus* 25923; 5. *Streptococcus agalactiae* 13813.



Fonte: Granja, 2019

Figura 3 - Colorações características de colônias de isolados bacterianos causadores de mastite inoculados em biplaca de meios de cultura cromogênicos (GP/GN): 1. *Staphylococcus aureus*; 2. *Staphylococcus chromogenes*; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Streptococcus uberis*; 5. *Escherichia coli*; 6. *Klebsiella* spp.; 7. *Streptococcus dysgalactiae*



Fonte: Granja, 2019