

BRENO LUIS NERY GARCIA

**Avaliação de meios de culturas cromogênicos para identificação rápida de  
bactérias Gram-positivas causadoras de mastite**

Pirassununga

2021

BRENO LUIS NERY GARCIA

**Avaliação de meios de culturas cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite**

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.

**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  
2021

**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 Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4030  
FMVZ

Garcia, Breno Luis Nery

Avaliação de meios de culturas cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite / Breno Luis Nery Garcia. – 2021.  
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2021.

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. Identificação microbiológica. 3. Mastite subclínica. 4. Meios de cultura cromogênicos. 5. Qualidade do leite. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de meios de cultura cromogênicos para diagnóstico rápido de bactérias gram-positivas causadoras de mastite subclínica", protocolada sob o CEUA nº 4579250719 (ID 007057), sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos e equipe; Breno Luis Nery Garcia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 30/09/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of chromogenic culture media for quick diagnosis of gram-positive bacteria causing subclinical mastitis", utilizing 1000 Bovines (1000 females), protocol number CEUA 4579250719 (ID 007057), under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos and team; Breno Luis Nery Garcia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/30/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2019 a 02/2020**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 8 anos**

N: **1000**

Linhagem: **Holandesa/Girolando**

Peso: **350 a 700 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado em seis fazendas leiteiras localizadas no estado de São Paulo (Martinópolis, Santa Cruz das Palmeiras, Charqueada, São Pedro e Itobi) e Minas Gerais (Passos).

Comentário da CEUA: *Projeto, Formulário CONCEA e TCLEs adequadamente apresentados.*

São Paulo, 06 de janeiro de 2021

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

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GARCIA, Breno Luis Nery

Título: Avaliação de meios de culturas cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite

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: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

*Toda e qualquer conquista, da mais trivial a mais extraordinária, é indubitavelmente resultante de um esforço feito a muitas mãos. Considerar o número de envolvidos no trabalho depende unicamente da capacidade analítica do observador, visto que não há no mundo esforço que não seja coletivo.*

*A ciência, campo em que se insere esta dissertação, não diferente, pretende ser uma força em constante movimento e evolução, na qual o sucesso de cada novo passo ambicionado depende sinergicamente da solidez dos passos anteriores. Cada descoberta, inovação ou criação de hoje, sem dúvidas valeu-se dos alicerces erguidos com empenho pelos cientistas de ontem, assim como o próprio conceito de ciência e sua abstração certamente advém do desenvolvimento tecnológico empírico e da sabedoria ancestral da humanidade.*

*As reduzidas páginas desta sessão de agradecimentos seriam seguramente insuficientes para contemplar todos aqueles que mereceriam de mim uma retribuição. Contudo, realizo aqui uma singela demonstração da minha gratidão aos mais próximos e, através deles, estendo meus agradecimentos a todos aqueles que minha capacidade analítica foi capaz de associar a esta conquista.*

*Primeiramente preciso agradecer a minha família (minha mãe Geórgia, meu pai Valério, meu irmão Jorge), e a minha namorada Laura por absolutamente tudo o que fizeram e ainda tem feito por mim, desenvolvendo o meu arcabouço de valores éticos, me dando todo o suporte emocional necessário e, desde sempre, atuando como vigas ou pilares de sustentação na construção de minha história.*

*Tenho também que agradecer ao meu orientador, prof. Marcos Veiga, e a todos aqueles que fazem ou fizeram parte do laboratório Qualileite (Bruna Gomes, Brunna Granja, Camylla Monteiro, Carlos Eduardo Fidelis, Cristian Martins, Danielle Fonseca, Eduardo Pinheiro, Gustavo Freu, José Garcia Moreno, Juliano Gonçalves, Larissa Martins, Lorena de Nicolo, Melina Barcelos, Renata Leite, Tiago Tomazi, todos os alunos de iniciação científica e todos os estagiários) por me auxiliarem durante todo o processo, dando suporte (tanto técnico quanto operacional) sempre que necessário, e atuando como parte ativa em meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*Agradeço também àqueles que, nas figuras do professor Paulo Leme, da Professora Roberta Brandi, do doutor Daniel Antonelo e do doutor Aduino Deufino, em algum momento de minha trajetória acreditaram em meu potencial e me incentivaram a progredir. Não há como deixar de agradecer a todos os amigos, que são ou foram importantes em algum momento da minha vida, e me ajudaram a fazer de mim quem eu sou hoje.*

*Agradeço a todos os funcionários de todas as fazendas partícipes, assim como todos os funcionários do departamento VNP FMVZ, pois sem o auxílio e cooperação destas pessoas, este experimento não seria possível. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e por isso agradeço também a CAPES pelo auxílio e por fornecer a bolsa, que foi meu sustento durante todo o período de mestrado.*

*Por fim, estendo meu agradecimento a todos os pesquisadores que contribuíram e têm contribuído com o desenvolvimento científico na área da qualidade do leite, pois é através da cooperação e da transmissão de saberes que alçaremos voo rumo ao progresso.*

*A todos, os meus mais sinceros agradecimentos. Sem esta colaboração nada disso seria possível. Hoje, através de todas essas indispensáveis ajudas, mais um ciclo se encerra em minha vida. É o fim de algo. É o começo de algo. Espero poder contar novamente com todos vocês para recomeçar.*

*Obrigado.*

*“É preciso imaginar Sísifo feliz.”*

*Albert Camus*



## RESUMO

GARCIA, B.L.N. 2021. **Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite** [Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of Gram-positive bacteria causing mastitis]. 2021. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho diagnóstico (especificidade, Sp; sensibilidade, Se; valor preditivo positivo, VPP; valor preditivo negativo, VPN; e acurácia, Ac) de dois meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus uberis/Enterococcus* spp.; *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*) causadoras de mastite subclínica (MSC) em vacas leiteiras. Para isso, foi avaliado o desempenho dos meios de cultura cromogênicos seletivos para bactérias Gram-positivas (GP) e *Staphylococcus* (S) (CHROMagar™, Paris – França) em amostras de leite provenientes de: 1) vacas com MSC durante a lactação (n = 504), e 2) vacas no período pós-parto (PP) (7 ± 3 dias pós parto; n = 536). A identificação rápida das bactérias Gram-positivas nos meios de cultura foi realizada por leitura visual da coloração das colônias após 24 h de incubação a 37°C. A identificação bacteriana por espectrometria de massas por MALDI-TOF MS de isolados em ágar sangue foi considerada a metodologia de referência para cálculo de: Ac, Se, Sp, VPP, VPN e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen. O meio GP apresentou alta acurácia de identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* tanto em amostras de MSC (Se: 89,1%; Sp: 96,3% e Ac: 95,6%) quanto em amostras de vacas em PP (Se: 100%; Sp: 99,0% e Ac: 99,1%). Resultados semelhantes foram observados para identificação de *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. (Se: 90,5%; Sp: 92,5% e Ac: 92,3%) em amostras de MSC e Se: 100%; Sp: 99,6% e Ac: 99,6% em amostras de vacas em PP com o uso do meio GP. No entanto, o meio GP apresentou baixa Se (25,0% em amostras de MSC e 50,0% em amostras de vacas em PP) na identificação de *Staphylococcus aureus*, apesar da alta Sp e Ac (Sp: 98,3% e Ac: 95,4% em amostras de MSC e Sp: 99,4% e Ac: 98,9% em amostras de vacas em PP). O meio de cultura S apresentou alta acurácia de identificação de *Staphylococcus aureus* (Se: 80,0%; Sp: 98,8% e Ac: 98,0% em amostras de MSC e Se: 66,7%; Sp: 100% e Ac: 99,6% em amostras de vacas em PP), apesar de a baixa prevalência dos patógenos *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* limitar inferências sobre a acurácia da identificação destes patógenos no meio S. Apesar da limitação do meio GP na identificação de *Staphylococcus aureus*, os resultados de Se e Sp para *Streptococcus*

*uberis/Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* foram, de forma geral, elevados, e o desempenho diagnóstico do meio S na identificação de *Staphylococcus aureus* foi satisfatório tanto em amostras de MSC quanto de PP. Portanto, os meios GP e S podem ser alternativas viáveis para identificação rápida de agentes causadores de MSC e para monitoramento de vacas PP em sistema de cultura microbiológica na fazenda.

**Palavras-chave:** Cultura na fazenda. Identificação microbiológica. Mastite subclínica. Meios de cultura cromogênicos. Qualidade do leite.

## ABSTRACT

GARCIA, B.L.N. 2021. **Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of Gram-positive bacteria causing mastitis** [Avaliação de meios de culturas cromogênicos para identificação rápida de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite]. 2021. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

The aim of the present study was to evaluate the diagnostic performance (specificity, Sp; sensitivity, Se; positive predictive value, PPV; negative predictive value, NPV; and accuracy, Ac) of two chromogenic culture media for rapid identification of Gram-positive bacteria (*Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.; *Streptococcus agalactiae*/*dysgalactiae*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis*) that cause subclinical mastitis (SCM) in dairy cows. For this purpose, the performance of the selective chromogenic culture media for Gram-positive (GP) and *Staphylococcus* (S) (CHROMagar™, Paris - France) in milk samples from: 1) cows with SCM during lactation (n = 504), and 2) cows in the postpartum period (PP) ( $7 \pm 3$  days postpartum; n = 536). Rapid identification of Gram-positive bacteria in the culture media was performed by visual inspection of colony colors after 24 h of incubation at 37 ° C. The bacterial mass spectrometry identification by MALDI-TOF MS of isolates on blood agar was considered the reference methodology for calculating: Ac, Se, Sp, VPP, VPN and Cohen's Kappa coefficient of agreement. The GP media showed high accuracy in the identification of *Streptococcus agalactiae*/*dysgalactiae* both in samples of SCM (Se: 89.1%; Sp: 96.3% and Ac: 95.6%) and in samples of cows in PP (Se: 100%; Sp: 99.0% and Ac: 99.1%). Similar results were observed for the identification of *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. (Se: 90.5%; Sp: 92.5% and Ac: 92.3%) in samples of SCM and Se: 100%; Sp: 99.6% and Ac: 99.6% in PP cow samples using the GP medium. However, the GP media showed low Se (25.0% in samples of SCM and 50.0% in samples of cows in PP) in the identification of *Staphylococcus aureus*, despite the high Sp and Ac (Sp: 98.3% and Ac: 95.4% in samples of SCM and Sp: 99.4% and Ac: 98.9% in samples of cows in PP). Culture media S showed high accuracy in the identification of *Staphylococcus aureus* (Se: 80.0%; Sp: 98.8% and Ac: 98.0% in SCM samples and Se: 66.7%; Sp: 100% and Ac: 99.6% in samples of cows in PP), although the low prevalence of the pathogens *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* limit inferences about the accuracy of the identification of these pathogens in the S environment. Despite the limitation of the GP media in the identification of *Staphylococcus aureus*, the results of Se and Sp for *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. and

*Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* were, in general, elevated, and the diagnostic performance of S media in the identification of *Staphylococcus aureus* was satisfactory in both SCM and PP samples. Therefore GP and S media may be viable alternatives for the rapid identification of SCM causing agents and for monitoring PP cows in on-farm microbiological culture systems.

**Key words:** On-farm culture. Microbiological identification. Subclinical mastitis. Chromogenic culture media. Milk quality.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Colorações características de colônias de *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae* (A: azul turquesa); *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.(B: azul escuro/metálico); *Staphylococcus aureus* (C: rosa/rosado) com crescimento em meio de cultura Mastitis GP (CHROMagar™, Paris – França). ..... 35
- Figura 2: Colorações características de colônias de *Staphylococcus aureus*.(A: rosa); *Staphylococcus epidermidis* (B: incolor/rosada); *Staphylococcus saprophyticus* (C: azul turquesa) com crescimento em meio de cultura Staphylococcus (CHROMagar™, Paris – França). ..... 36
- Figura 3: Comparação entre os resultados de identificação microbiológica presuntiva dos meios de cultura cromogênicos GP e Staphylococcus (CHROMagar™, Paris – França) e a identificação microbiológica por MALDI-TOF MS dos isolados em ágar sangue (teste padrão) para determinação dos resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos e posterior avaliação do desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos para amostras de mastite subclínica e leite de vacas em pós parto ..... 40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Frequência de isolamento de agentes causadores de mastite isolados a partir de amostras de mastite subclínica inoculadas nos meios de cultura: ágar sangue, Mastitis GP e *Staphylococcus*, identificados através da metodologia MALDI-TOF MS.....44
- Tabela 2: Frequência de isolamento de agentes causadores de mastite isolados a partir de amostras de leite de vacas em pós-parto inoculadas nos meios de cultura: ágar sangue Mastitis GP e *Staphylococcus*, identificados através da metodologia MALDI-TOF MS. ....46
- Tabela 3: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico Gram-positivo em amostras de leite de vacas com mastite subclínica (n = 504). ....48
- Tabela 4: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico *Staphylococcus* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica (n = 504). ..... 50
- Tabela 5: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico Gram-positivo em amostras de leite de vacas em pós-parto (n = 536). ....52
- Tabela 6: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico *Staphylococcus* em amostras de leite de vacas em pós-parto (n = 536). ....54

## LISTA DE ABREVIATURAS

BEN	Balanço energético negativo
CCS	Contagem de células somáticas
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
CMF	Cultura microbiológica na fazenda
CONCEA	Conselho nacional de controle da experimentação animal
DEL	Dias em lactação
FMVZ	Faculdade de medicina veterinária de zootecnia
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
IIM	Infecção intramamária
<i>K</i>	Coefficiente <i>Kappa</i> de Choen
KOH	Hidróxido de potássio
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz através do tempo de voo
MC	Mastite clínica
MSC	Mastite subclínica
NMC	<i>National Mastitis Council</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PP	Pós-parto
qPCR	PCR em tempo real
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
Se	Sensibilidade
SNA	<i>Staphylococcus não aureus</i>
Sp	Especificidade
USP	Universidade de São Paulo

VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1. CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE .....	20
<b>3.1.1. Mastite clínica</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1.2. Mastite subclínica</b> .....	<b>22</b>
3.2. DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MASTITE SUBCLÍNICA .....	23
<b>3.2.1. Ocorrência de MSC durante a lactação</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.2. Mastite em período pós-parto (PP)</b> .....	<b>25</b>
3.3. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE....	26
<b>3.3.1. Cultura Microbiológica</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.2. Espectrometria de massas por MALDI-TOF MS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3.3. Técnicas de biologia molecular aplicadas à identificação de agentes causadores da mastite</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3.4. Sistemas de Cultura Microbiológica na Fazenda (CMF)</b> .....	<b>30</b>
3.3.4.1. Uso de Meios de Cultura Cromogênicos na CMF .....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1. LOCAL, INSTALAÇÕES, SELEÇÃO DE VACAS E COLETA DE AMOSTRAS .....	33
4.2. MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS .....	34
4.3. AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE .....	36
4.4. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MALDI-TOF MS .....	37
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
5.1. FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO .....	42
5.2. DESEMPENHO DIAGNÓSTICO .....	46
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>

<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Mastite é a doença que mais acarreta prejuízos à bovinocultura leiteira (RUEGG, 2017). A forma mais prevalente da doença é a mastite subclínica (MSC) (PUMIPUNTU et al., 2017), que resulta na diminuição da produção de leite, aumento na contagem de células somática (CCS) e aumento do risco de ocorrência de casos de mastite clínica (MC) durante a lactação (REKSEN, 2006; BORNE et al., 2011; BORNE et al., 2019).

A disseminação da MSC no rebanho ocasiona perdas econômicas diretas e indiretas na rentabilidade das fazendas, associadas em especial à diminuição da produção de leite (GONÇALVES et al., 2018a; HOGEVEEN et al., 2011). Estas perdas são ainda agravadas quando os agentes causadores de MSC são bactérias de transmissão contagiosa, que podem ser transmitidas entre vacas de um mesmo rebanho (CERVINKOVA et al., 2013) e, nesse sentido, o controle da disseminação da MSC é essencial para a rentabilidade da produção leiteira. Para que este controle seja feito de forma eficiente, a identificação rápida e assertiva dos agentes causadores de mastite é fundamental.

A cultura microbiológica do leite em laboratórios especializados é o método padrão de identificação dos agentes causadores de mastite. No entanto, este método de identificação ainda é pouco utilizado em rebanhos leiteiros (MCCARRON et al., 2009b). Os principais entraves para uso da cultura microbiológica laboratorial são as limitações de logística e de custo de envio das amostras, e o tempo da análise até à obtenção dos resultados que pode ser de 3 - 5 dias (LAGO et al., 2011a). Alternativamente, a cultura microbiológica na fazenda pode ser usada para identificação rápida dos patógenos causadores, o que possibilita maior agilidade na tomada de decisões para tratamento e medidas preventivas ou de controle da mastite (MCCARRON et al., 2009b). A identificação rápida e precisa dos patógenos causadores de MSC pode auxiliar na orientação de medidas de contenção do patógeno no rebanho, tratamentos estratégicos para a infecção intramamária (IIM), quando o tratamento é viável, ou secagem seletiva das vacas (LAGO, 2009).

Meios de cultura cromogênicos são alternativas de identificação microbiológica rápida, pois permitem diferenciar presuntivamente espécies e/ou grupos bacterianos de acordo com a coloração das colônias, com menor necessidade de realização de testes bioquímicos (PERRY, 2017). Enzimas específicas produzidas de acordo com o metabolismo de microrganismos reagem com componentes presentes nos meios de cultura cromogênicos, o que promove a formação de cromóforos, responsáveis por alterar a coloração das colônias e

possibilita a identificação bacteriana (GANDA et al., 2016). Estes meios apresentam desempenho superior aos demais métodos rápidos microbiológicos convencionais (e.g., Triplacas Minnesota Easy System; Quadriplacas Mastitis SSGN) em relação à especificidade (Sp), sensibilidade (Se) e acurácia (Ac; FERREIRA et al., 2018), além de identificar contaminação nas amostras de forma mais eficiente (GRIFFIOEN et al., 2018), o que minimiza a ocorrência de falsos positivos na identificação dos agentes. O uso de meios cromogênicos para detecção de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de MC apresentou 90% de Se e 99% de Sp (GRANJA, 2020). O uso de meios de cultura cromogênicos na rotina das fazendas é uma alternativa para identificação rápida de mastite subclínica, porém ainda não foi avaliada a eficácia destes meios para amostras de MSC, e para o monitoramento de vacas em pós-parto (PP), período em que se manifestam novas IIM ou mesmo as não curadas durante o período seco (ARRUDA et al., 2013).

Considerando a praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, os meios cromogênicos são uma abordagem eficiente e inovadora para sistemas de cultura microbiológica na fazenda (CMF). Dessa forma, a hipótese do presente estudo é de que os meios cromogênicos Mastitis GP e *Staphylococcus* (CHROMagar™, Paris - France), seletivos para bactérias Gram-positivas (GP) e *Staphylococcus* spp. (S) respectivamente, apresentam desempenho diagnóstico satisfatório em comparação ao método de identificação padrão (cultura e identificação microbiológica por MALDI-TOF MS) para identificação rápida dos principais agentes causadores de MSC durante a lactação e no PP.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o desempenho diagnóstico [Se; Sp; valor preditivo positivo (VPP); valor preditivo negativo (VPN) e Ac] de meios de cultura cromogênicos para identificação presuntiva dos principais agentes Gram-positivos causadores de MSC (*Streptococcus uberis*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus dysgalactiae*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*).

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a Sp, Se e Ac de dois meios de cultura cromogênicos seletivos para bactérias Gram-positivas (GP) e *Staphylococcus* (S) para identificação microbiológica presuntiva de agentes causadores de mastite em: a) amostras de leite de MSC durante a lactação; b) amostras de leite de vacas  $7 \pm 3$  dias PP.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE

A mastite bovina caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária, causada principalmente por infecções bacterianas. As novas infecções intramamárias ocorrem quando microrganismos invadem a glândula mamária pelo canal dos tetos e utilizam os substratos da secreção láctea para sua multiplicação (HOGAN; SMITH, 2003). A mastite pode ser classificada de acordo com a forma de apresentação e com o tipo de agente causador (CERVINKOVA et al., 2013). Quanto à forma de apresentação, a mastite pode se manifestar como clínica (e.g., alterações visíveis no leite e/ou sinais de inflamação no quarto mamário acometido) ou subclínica (e.g., alterações na composição do leite sem a presença de sinais clínicos) (DE VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018). Quanto ao tipo de agente causador, a mastite pode ser classicamente classificada em contagiosa (e.g., *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma* spp.) ou ambiental (e.g. *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Enterococcus* spp.) (CERVINKOVA et al., 2013), apesar de atualmente esta classificação não ser considerada absoluta, pois alguns agentes apresentam ambos as formas de transmissão (eg. *Streptococcus dysgalactiae*) (FOX; GAY, 1993).

Os patógenos de perfil de transmissão contagiosa (e.g., *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*) são as principais causas associadas com a MSC, por serem adaptados à glândula mamária (CERVINKOVA et al., 2013). Além destes, o grupo dos *Streptococcus* ambientais também são causas frequentes de MSC. Por outro lado, coliformes e bactérias Gram-negativas geralmente manifestam-se na forma clínica (HARMON, 1994). Sendo assim, o diagnóstico rápido e preciso dos agentes causadores da mastite possibilita

adequar tratamentos bem como as medidas de manejo, o que objetiva o sucesso no controle da mastite.

### 3.1.1. Mastite clínica

A MC manifesta-se por alterações nas características do leite e/ou sinais clínicos aparentes na glândula mamária. Associam-se à MC anormalidades no aspecto do leite (grumos, sangue ou pus); do úbere (vermelhidão e inchaço) (REES; HEUWIESER, 2017) e sinais clínicos como febre, letargia e desidratação (FOGSGAARD; BENNEDSGAARD; HERSKIN, 2015).

Os principais agentes causadores de MC são transmitidos a partir do ambiente. Dentre estes se destacam bactérias Gram-negativas e espécies de *Streptococcus*, que podem ter transmissão tanto ambiental quanto contagiosa (e.g. *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*; ZADOKS; SCHUKKEN, 2006).

Enterobactérias tem alta prevalência como causa de MC por serem encontradas amplamente nas fezes de bovinos, apresentando grande potencial de contaminação ambiental dos tetos. *Escherichia coli* é um dos patógenos mais prevalentes como causa de MC, associando-se a processos infecciosos de gravidade variada (BOGNI et al., 2011). *Klebsiella* spp. também é pertencente ao grupo das enterobactérias e pode estar associada a casos mais graves e de longa duração (ZADOKS et al., 2011).

De acordo com a gravidade do processo infeccioso, a MC pode ser classificada em escores: leve (escore 1), moderada (escore 2) e grave (escore 3). São considerados escore 1 os casos que apresentam apenas alterações físicas no leite (e.g., presença de grumos, alterações na cor e viscosidade); escore 2 os que apresentam alterações físicas no leite e perceptíveis sinais inflamatórios no úbere (e.g., enrijecimento, edema, dor e rubor localizado) e escore 3 os que apresentam anormalidades físicas no leite, sinais inflamatórios no úbere e sintomatologias sistêmicas (e.g., temperatura  $>39,5^{\circ}\text{C}$ , inapetência, desidratação, atonia ruminal e anorexia) (WENZ; GARRY; BARRINGTON, 2006). A avaliação da gravidade da MC é uma etapa essencial para as decisões dos protocolos de tratamento e medidas de controle mais específicos e eficazes (ROYSTER et al., 2014).

Os sinais clínicos e alterações visuais associados à MC facilitam a identificação da enfermidade durante os procedimentos de ordenha (MOREIRA et al., 2018) o que proporciona a adoção rápida de protocolos de tratamento (SWINKELS et al., 2015).

Adicionalmente, os casos de MC leves e moderados causados por bactérias Gram-negativas apresentam elevada cura espontânea, não sendo recomendada a antibioticoterapia na maioria destes casos, quanto está disponível a identificação microbiológica na fazenda (TOMAZI et al., 2018).

### **3.1.2. Mastite subclínica**

A MSC é a forma mais prevalente da doença nos rebanhos leiteiros, podendo ser 40 vezes mais comum do que a forma clínica (PUMIPUNTU et al., 2017). Caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária sem que haja alterações visíveis no leite e no úbere das vacas acometidas (DAMM; CLEMENTS, 2017). Com a resposta inflamatória da glândula mamária frente à injúria causada pelos agentes patogênicos, há o recrutamento de células de defesa ao sítio inflamatório na glândula mamária. O aumento das células de defesa, juntamente a descamação de células do epitélio secretor dos alvéolos, leva ao aumento da contagem de células somáticas (CCS; HARMON, 1994). A CCS é importante indicador de MSC em rebanhos e vacas leiteiras e vem sendo amplamente utilizada para estimar a prevalência e a incidência da mastite subclínica nos rebanhos e vacas leiteiras (BUSANELLO et al., 2017). Vacas com CCS < 200.000 células/mL em amostras compostas têm ausência de inflamação intramamária, enquanto que valores superiores são indicativo de ocorrência de mastite subclínica (DÜRR et al., 2008; GONÇALVES et al., 2018).

Vacas com MSC produzem menos leite, apresentam alta CCS, têm maior probabilidade de desenvolverem MC e, conseqüente, maior risco de descarte precoce do rebanho (REKSEN, 2006; BORNE et al., 2011; BORNE et al., 2019), o que acarreta perdas econômicas, impactando negativamente a rentabilidade da produção leiteira (GONÇALVES et al., 2018a; HOGVEEN et al., 2011). Os prejuízos causados pela enfermidade são maiores quando os principais agentes relacionados à MSC são as bactérias contagiosas (CERVINKOVA et al., 2013), pois há risco de transmissão destes agentes entre as vacas do rebanho. Vacas com MSC podem, ainda, servir como reservatórios, o que facilita a transmissão às vacas sadias (RATO et al., 2009).

## 3.2. DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MASTITE SUBCLÍNICA

### 3.2.1. Ocorrência de MSC durante a lactação

A MSC durante a lactação causa prejuízos diretos e indiretos à rentabilidade da produção leiteira. A perda de produção é considerada o maior custo associado à MSC (SEEGERS et al., 2003), representando aproximadamente de 70 a 80% dos custos totais associados à enfermidade (HUIJPS; LAM; HOGEVEEN, 2008). No Brasil, estima-se que as perdas de produção causadas por MSC variem de 1,4 a 4,8%, para uma primípara, e de 4,8 a 10,4% para uma múltipara (GONÇALVES et al., 2018b). Concomitantemente, a ocorrência de casos de MSC no rebanho pode levar ao aumento na CCS do tanque, o que também acarreta perdas na rentabilidade na produção. Observa-se diminuição da receita/vaca/ano de \$ 228,5 e diminuição de \$ 138,6 no lucro/vaca/ano proporcionalmente para cada aumento de uma unidade de log de CCS do tanque (GONÇALVES et al., 2020).

Ademais, quando a MSC é causada por bactérias contagiosas, há alto risco de disseminação rápida do patógeno no rebanho (CERVINKOVA et al., 2013), o que torna fundamental a adoção rápida de medidas de controle do contágio. O tratamento da MSC durante a lactação só é indicado em casos específicos, em que o agente causador responda de forma efetiva à antibioticoterapia, sendo passível de erradicação no rebanho (eg. *Streptococcus agalactiae*) (KEEFE, 2012). Nos demais casos, o tratamento durante a lactação pode ser ineficaz, ou inviável do ponto de vista financeiro, sendo mais indicado o tratamento na secagem, que apresenta maior eficácia, podendo apresentar taxa de cura <90% (FREU et al., 2020; NATZKE, 1971). Por estes motivos, as principais medidas de controle da MSC em rebanhos leiteiros demandam a identificação rápida dos patógenos causadores, para a adoção das medidas adequadas para cada caso.

*Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de MSC em rebanhos leiteiros (80 - 100% dos rebanhos têm pelo menos uma vaca positiva, com estimativa de 5 a 10% das vacas infectadas) (PUMIPUNTU et al., 2017). Com grande capacidade de transmissão, este patógeno associa-se a casos de MSC crônicos, de difícil tratamento e com taxas de cura inferiores a 25% (MISRA et al., 2018). Adicionalmente, *Staphylococcus aureus* apresenta elevada resistência aos antimicrobianos, dificultando o tratamento (OB Aidat; Bani Salman; Roess, 2018). A aquisição de material genético de outros microrganismos por transmissão horizontal possibilita a *Staphylococcus aureus* a obtenção de genes capazes de codificar a resistência a múltiplos antimicrobianos (Pantosti; Sanchini; Monaco,



2007; OBAIDAT; SALMAN; ROESS, 2017). Somado a isto, a capacidade de *Staphylococcus aureus* de produção de biofilme proporciona de 10 a 10.000 vezes mais proteção contra antimicrobianos, comparativamente aos microrganismos sem a capacidade de produção de biofilme (GOMES; FERREIRA; HENRIQUES, 2019).

*Streptococcus agalactiae*, assim como *Staphylococcus aureus*, apresenta transmissão contagiosa, demandando controle preventivo e estratégico, com objetivo de reduzir novas infecções (CERVINKOVA et al., 2013). As IIM causadas por *Streptococcus agalactiae* caracterizam-se por casos crônicos e subclínicos, com alta CCS (REYES et al., 2015), episódios intermitentes de MC (LEELAHAPONGSATHON; SCHUKKEN, 2014), diminuição na produção de leite (WILSON et al., 1997; ROSSI et al., 2018) e alto contágio (LEELAHAPONGSATHON et al., 2016). Devido à grande capacidade de disseminação entre vacas de um mesmo rebanho, a rápida identificação das vacas infectadas é essencial para o controle destes agentes em fazendas leiteiras. O tratamento dos casos de MSC causada por *Streptococcus agalactiae* durante a lactação pode ser indicado, visto que *Streptococcus agalactiae* é patógeno obrigatório do úbere e altamente responsivo aos antimicrobianos (~95% de cura). A erradicação deste agente no rebanho através de identificação e tratamento das vacas infectadas é, portanto, possível. (KEEFE, 2012).

*Streptococcus* ambientais são incluídos entre os principais grupos de bactérias causadores de mastite bovina, sendo responsáveis por de 13 a 44% dos casos (RUEGG, 2012). *Streptococcus dysgalactiae* é uma importante causa de MSC de origem ambiental (LUNDBERG et al., 2016). Associam-se a IIM por este patógeno: aumentos na CCS, diminuição na produção de leite e maior risco de descarte precoce de vacas positivas para *Streptococcus dysgalactiae* (WHIST; O. ØSTERA°S; SØLVERØD, 2007). Apesar da transmissão predominantemente ambiental, padrões de infecção semelhantes aos de *Staphylococcus aureus* foram observados em *Streptococcus dysgalactiae*, o que sugere que em alguns rebanhos ocorra transmissão contagiosa (FOX; GAY, 1993). Adicionalmente, a variação genotípica de *Streptococcus dysgalactiae* isolado de mastite é maior do que a de *Staphylococcus aureus* (LUNDBERG et al., 2016), o que propicia a alta capacidade de disseminação nos rebanhos.

*Streptococcus uberis* é um dos principais agentes causadores de MSC em vacas leiteiras (ZADOKS; MIDDLETON, 2011). Apesar de apresentar transmissão contagiosa entre vacas no rebanho (ZADOKS; SCHUKKEN, 2006), *Streptococcus uberis* tem no ambiente o principal reservatório. Por esse motivo, as condições de higiene das instalações e bons procedimentos de ordenha são medidas necessárias para o controle deste patógeno (SAMSON

et al., 2016; BARKEMA et al., 1999). Contudo, quando o controle não é bem-sucedido, ocorrem casos de infecção crônica. O uso de terapias estendidas em casos de mastite crônica, apesar de ser indicado em alguns casos (OLIVER et al., 2004), pode levar ao aumento da resistência de *Streptococcus uberis* aos antimicrobianos, dificultando ainda mais o controle no rebanho (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003; OLIVER; MURINDA, 2012). Vacas de primeira ou segunda lactação tendem a responder melhor ao tratamento do que vacas mais velhas (SAMSON et al., 2016). Medidas preventivas e o conhecimento do patógeno no princípio da infecção são fundamentais para as ações de controle e profilaxia.

### **3.2.2. Mastite em período pós-parto (PP)**

Após o parto, as vacas podem passar por um período de balanço energético negativo (BEN). A incapacidade de consumir a quantidade de energia necessária para a manutenção e produção de leite, leva à mobilização das reservas energéticas em tecido adiposo, acarretando desordens metabólicas como o aumento sérico de ácidos graxos não esterificados e cetonemia (PIÑEIRO et al., 2019). O grau de intensidade do BEN no início do PP e a rapidez de recuperação das vacas são preponderantes para a saúde e a produtividade das vacas, em especial as de alta produção (REIST et al., 2002).

As alterações metabólicas do PP estão associadas com imunossupressão, e outros fatores estressores, o que reduz a capacidade de resposta imune contra as IIMs (AMARAL et al., 2011). Teores plasmáticos aumentados de ácidos graxos não esterificados e beta-hidroxi-butirato prejudicam a migração e atividade fagocítica de leucócitos polimorfonucleares na glândula mamária, o que aumenta o risco de novos casos de mastite (HUSZENICZA et al., 2004; SURIYASATHAPORN et al., 1999). Contudo, em períodos curtos de BEN, a quimiotaxia e a atividade leucocitária na glândula mamária não é afetada, o que indica uma associação entre a duração e gravidade do BEN e a capacidade funcional dos leucócitos na glândula mamária de vacas em PP (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

Alem da mastite outras desordens metabólicas podem estar relacionadas ao PP: edema do úbere, edema dos tetos, sangue no leite, ou vazamento de leite (WAAGE et al., 2001). Esta associação é explicada parcialmente pela piora nas condições da extremidade dos tetos, comprometimento das funções do esfíncter do teto e diminuição nas condições e higiene de ordenha (MORRISON; DEVRIES; LEBLANC, 2018). Contudo, as causas destas desordens metabólicas e sua relação com a mastite não foram completamente elucidadas. Em

novilhas, os casos de mastite nas primeiras semanas PP aumentam o risco de novos casos futuros. Os tetos menores do que 35 mm e/ou com diâmetro menor do que 18 mm são fatores de conformação predisponentes a mastite nesses animais (KRÖMKER et al., 2012).

O período seco também tem influencia na ocorrência de casos de mastite no PP. A presença de IIM pré-existente, se não curada durante o período seco, aumenta o risco de MC na próxima lactação. Além disso, novas infecções intramamárias também podem ocorrer durante o período seco, manifestando-se clinicamente, principalmente, no início da próxima lactação (ARRUDA et al., 2013). Estima-se que 55% das IIM de transmissão ambiental associadas ao período seco persistem à lactação, podendo causar quadros de MC (TODHUNTER; SMITH; HOGAN, 1995).

O tratamento da mastite PP deve ser baseado na avaliação se a vaca possui fatores de risco que indicam que a antibioticoterapia será eficaz. A administração de antibióticos intramamários de curta duração, pode ser considerada em casos leves e moderados nas vacas mais velhas. No entanto, nas vacas com histórico de sucessivos casos de MC não graves, pode-se realizar a espera vigilante (RUEGG, 2018). O conhecimento dos patógenos causadores de mastite também é relevante na decisão sobre tratamento no PP. Em novilhas, há maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) no PP (KRÖMKER et al., 2012), cujo tratamento geralmente não é recomendado, apenas espera vigilante. A identificação microbiológica é, portanto, necessária para o controle da mastite PP.

### 3.3. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE

#### 3.3.1. Cultura Microbiológica

A CM é o método padrão para identificação de agentes causadores de mastite, sendo realizada em amostras de leite de tanque e/ou amostras individuais por vaca ou por quarto mamário (ADKINS, 2018). O método consiste da inoculação de 10 µL de leite em meio de cultura não seletivo (Ágar sangue), seguida por incubação a 37°C por 24 - 48h (NMC, 2017). Posteriormente, são realizadas leituras para avaliação fenotípica do crescimento das colônias, levando-se em consideração os seguintes aspectos: número de colônias, tamanho, morfologia, pigmentação e hemólise. Em alguns casos, as características morfológicas, associadas à capacidade de crescimento em meios seletivos são suficientes para direcionar a identificação

do microrganismo em nível de gênero ou espécie (TANG e STRATTON, 2006). No entanto, testes bioquímicos podem ser necessários para a identificação definitiva dos agentes causadores de mastite (PERRY, 2017).

Após o isolamento primário, a identificação de microrganismos consiste em submeter as colônias ao teste do Hidróxido de Potássio (KOH) para diferenciação de bactérias Gram-positivas (negativas para o teste) e Gram-negativas (positivas para o teste). É realizado o teste da catalase para diferenciação entre os grupos *Streptococcus* spp. (catalase negativa) e *Staphylococcus* spp. (catalase positiva). A morfologia dos microrganismos pode ser avaliada por microscopia óptica e coloração de Gram, sendo possível diferenciar cocos e bastonetes e identificar microrganismos com morfologia característica (e.g., *Corynebacterium* spp.).

Cocos Gram-positivos catalase-positiva, identificados como *Staphylococcus* spp. são submetidos ao teste da coagulase e, de acordo com o resultado, classificados em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva. Isolados coagulase-positiva são submetidos ao teste de aglutinação em látex, utilizado para diferenciação entre *Staphylococcus aureus* (resultado positivo) e *Staphylococcus* coagulase positiva não-*aureus* (resultado negativo).

Cocos Gram-positivos catalase-negativa, identificados como *Streptococcus* spp. são submetidos ao teste Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP)/esculina. O teste consiste em ágar sangue enriquecido com esculina, no qual uma cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* é inoculada de forma retilínea no meio da placa, e a cepa a ser testada é inoculada em sentido perpendicular próxima a *Staphylococcus aureus*. O escurecimento do meio indica esculina positiva, enquanto que a interação da cepa com a hemólise de *Staphylococcus aureus* indica CAMP positivo. Isolados CAMP-positivo/esculina-negativa são identificados como *Streptococcus agalactiae*, CAMP-negativo/esculina-negativa são diagnosticados como *Streptococcus dysgalactiae*. Isolados esculina-positivos são submetidos ao teste da bile esculina em que *Streptococcus uberis* apresenta resultado negativo e *Enterococcus* spp. apresentam resultado positivo (NMC 2017).

Contudo, o uso da CM apresenta alguns entraves que dificultam sua execução na rotina das fazendas leiteiras. A logística de envio de amostras ao laboratório e o tempo necessário para a emissão do laudo de identificação microbiana (de 5 a 7 dias), geram custos com descarte de leite, e piora no quadro de mastite, levando a decisões inespecíficas com relação a tratamentos (LAGO et al., 2011b).

### 3.3.2. Espectrometria de massas por MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz através do tempo de voo (MALDI-TOF MS) é um método rápido de detecção de bactérias e leveduras em microbiologia clínica, com grande aplicabilidade e potencial de expansão na rotina dos laboratórios (BRAGA et al., 2013). As espécies de microrganismos apresentam um *fingerprint* (impressão digital) único e característico, constituído por seu perfil de proteínas ribossomais. Este conjunto de proteínas pode ser utilizado para identificação do gênero e da espécie bacteriana através da comparação com um banco de dados pré-estabelecido (WIRTH et al., 2012). Dessa forma, MALDI-TOF MS é uma ferramenta simples e rápida de identificação de agentes causadores de mastite (BARCELOS et al., 2019).

Após a extração das proteínas ribossomais, a amostra é misturada à matriz constituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em 50% de acetonitrilo e 2,5% de ácido trifluoroacético. A mistura entre a amostra e a matriz, após cristalização, é analisada por MALDI-TOF MS e levada à dessorção e ionização pela energia a laser. Os íons são acelerados através de um campo eletromagnético em um tubo de vácuo (tubo de vôo). O tempo de voo necessário para os íons atingirem o detetor depende da relação massa e a carga do íon, sendo que íons menores viajam mais rápido que os maiores. Os espectros gerados resultam no *fingerprint* do microrganismo que é comparado ao banco de dados do software para a identificação do agente (DE CAROLIS et al., 2014; BARREIRO et al., 2010).

A metodologia MALDI-TOF MS apresenta-se como uma alternativa rápida e eficiente em termos de materiais e mão de obra na identificação microbiológica laboratorial da mastite (NONNEMANN et al., 2019). Experimentalmente, já foram obtidos resultados de identificação para agentes causadores de mastite a partir do leite, sem necessidade de cultura microbiológica prévia (BARREIRO et al., 2017), contudo este método precisa de mais estudos e ainda não é aplicado na rotina dos laboratórios.

### 3.3.3. Técnicas de biologia molecular aplicadas à identificação de agentes causadores da mastite

As técnicas de biologia molecular são alternativas para a identificação com alta precisão e rapidez agentes causadores de mastite, tanto quantitativa quanto qualitativa, podendo ser feitos diretamente pelas amostras de leite, sem necessidade de cultura microbiológica prévia. (EL-SAYED et al., 2017). O emprego destas técnicas é uma

alternativa viável para a identificação de agentes de difícil detecção através dos métodos convencionais de identificação microbiológica (eg. *Mycoplasma* spp.) (CANTEKİN et al., 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é, dentre as técnicas moleculares, uma das mais importantes do ponto de vista da mastite. A técnica consiste na utilização de primers específicos para cada patógeno, que se ligam a sequências predeterminadas do DNA alvo presente na amostra, amplificando-o. Através da amplificação destas sequências, únicas para o microrganismo, pode ser realizada a identificação em nível de espécie ou subespécie (EL-SAYED et al., 2017).

Similarmente a técnica de PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) também detecta microrganismos em amostras de leite através da amplificação de sequências de DNA alvo, porém não necessita de confirmação da amplificação por gel de eletroforese, promovendo, em oposição, um resultado quantitativo, estimado a partir do número de ciclos necessário para a emissão de um sinal de fluorescência (associado ao número de amplificações da sequência de DNA alvo). A qPCR permite estabelecer um limite quantitativo de detecção de microrganismos (e.g., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) em uma amostra de leite com mastite (CHANDRASHEKHAR et al., 2015), e pode ser usada para a detecção de agentes causadores de mastite (eg. *Staphylococcus aureus*) em amostras de tanque alta Se e Sp (SYRING et al., 2012).

Outra importante técnica de biologia molecular que pode ser empregada na identificação de agentes causadores de mastite é o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA). A técnica é considerada o método de referência na identificação bacteriana, sendo amplamente aplicada com finalidade taxonômica e filogenética (BECKER et al., 2004; LANGE et al., 2011). O sequenciamento do gene 16S permite a diferenciação entre isolados fenotipicamente semelhantes, indistinguíveis pelos métodos tradicionais de cultura microbiológica (AJITKUMAR; BARKEMA; BUCK, 2012; BANNERMAN et al., 1993; BECKER et al., 2004).

Os primeiros 500 pares de base do gene 16S rRNA são a faixa mais comum para a identificação bacteriana, e são excelente alvo para *Staphylococcus* spp. (LANGE et al., 2015) e *Streptococcus* spp. (RATO et al., 2009; WILSON; ADKINS, 2019). A capacidade de diferenciação entre isolados fenotipicamente semelhantes como *Streptococcus uberis* e *Streptococcus parauberis* (RATO et al., 2009) faz da técnica de sequenciamento do gene 16S um método útil e confiável para confirmação da identificação de isolados de microrganismos. O uso de técnicas de biologia molecular em uma parcela das amostras é indicado na rotina de

identificação de agentes causadores de mastite a fim de aferir a dimensão da margem de erro do método laboratorial padrão de identificação da mastite (AKINEDEN et al., 2019).

As técnicas de biologia molecular são de evidente utilidade no controle da mastite, mas apresentam alguns entraves práticos. O elevado custo por amostra para a identificação microbiológica, assim como a necessidade de equipamentos e métodos muito especializados dificulta a aplicação destas técnicas na rotina diagnóstica dos rebanhos leiteiros. A aplicabilidade da biologia molecular para o controle da mastite se da, em geral, em agentes específicos de difícil identificação (e.g. *Mycoplasma* spp.) (CANTEKİN et al., 2014) e no âmbito experimental. Para a implementação de rotina de identificação microbiológica nos rebanhos são necessárias técnicas de maior aplicabilidade a campo.

### **3.3.4. Sistemas de Cultura Microbiológica na Fazenda (CMF)**

Os sistemas de CMF na fazenda são ferramentas de identificação microbiológica rápida de agentes causadores MC e MSC aplicada a rebanhos leiteiros na própria fazenda (LAGO; GODDEN, 2018). O método consiste no uso de meios de cultura seletivos para diferenciar categorias e/ou espécies de agentes causadores de mastite, gerando resultados rápidos: de 18 a 24 horas após a coleta da amostra (ROYSTER et al., 2014; LAGO et al., 2011a; GANDA et al., 2016). Apesar de não substituírem completamente e não apresentarem a precisão da cultura microbiológica em laboratório, a CMF é usada para orientar decisões estratégicas de tratamento da mastite e/ou medidas de manejo (ROYSTER et al., 2014). Dentre as vantagens do uso da CMF destacam-se a não necessidade de envio de amostras laboratoriais, rápida obtenção de resultados e custo similar ao das culturas microbiológicas laboratoriais (GANDA et al., 2016; VIORA et al., 2014).

A realização de tratamento seletivo de mastite clínica, com base na identificação microbiológica dos agentes causadores de mastite na própria fazenda, possibilita diminuição do uso de antimicrobianos, sem acarretar prejuízos na eficácia dos tratamentos ou na saúde e produtividade das vacas (LAGO; GODDEN, 2018; LAGO et al., 2011a; RUEGG et al., 2005). Com isso, há diminuição dos custos associados à terapia da mastite, diminuição do risco da presença de resíduo de antibiótico no leite e diminuição no potencial de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em patógenos causadores de mastite (LAGO et al., 2011a; LAGO et al., 2011b).

A abordagem de uso da CMF depende do objetivo visado pelo produtor, podendo a cultura ser realizada em nível de rebanho, vaca ou quarto mamário (BOGNI et al., 2011). Vários sistemas de CMF foram avaliados para identificação dos agentes principais causadores de mastite. Os meios de cultura mais simples inicialmente utilizados consistiam em placas de ágar sangue e McConkey que permitiam a diferenciação de microrganismos Gram-positivos e Gram-Negativos (GANDA et al., 2016). Recentemente, com a evolução de novos e mais sofisticados meios de cultura, tornou-se viável a identificação presuntiva de patógenos quanto a grupos, gênero e quanto à espécie (ROYSTER et al., 2014; FERREIRA et al., 2018).

Viora et al. (2014) avaliaram um kit de identificação rápido de agentes causadores de mastite ('VetoRapid', Vetoquinol) em comparação à análise laboratorial padrão, para identificar agentes causadores de mastite, e possibilitar a aplicação de programas de tratamento seletivos em rebanhos leiteiros. Amostras de MC e MSC foram analisadas segundo os dois métodos e a eficácia do kit foi avaliada por meio dos seguintes indicadores de desempenho: Ac, Se, Sp, VPN, VPP e coeficiente *Kappa*. Foram obtidos resultados de Se e Sp de 91% e 78%, respectivamente, para a capacidade de identificação de microrganismos Gram-positivos. Os resultados indicaram que o método é adequado para direcionar o tratamento seletivo da mastite a campo.

Adicionalmente, Lago et al. (2011a) avaliaram amostras de vacas diagnosticadas com casos leves e moderados de MC por CMF. As vacas foram aleatoriamente distribuídas em 2 grupos, sendo um grupo no qual todas as vacas receberam tratamento para mastite, e um grupo tratamento seletivo, no qual a utilização ou não de antimicrobianos foi determinado pelos resultados da cultura na fazenda. No grupo tratamento, a identificação microbiológica foi realizada pelo Minnesota Easy Culture System, que consiste em uma biplaca contendo ágar McConkey (seletivo para bactérias Gram-negativas) e ágar Factor (seletivo para bactérias Gram-positivas). Não foi observada diferença entre os grupos em relação à: falha no tratamento, taxa de cura bacteriológica após 21 dias, recorrência da mastite e risco de novas infecções. Adicionalmente, a aplicação do CMF reduziu pela metade o uso de antimicrobianos e diminuiu em um dia o descarte de leite sem afetar o tempo de cura da MC.

Em outro estudo, a utilização de Petrifilm em CMF foi testada para tratamento seletivo na secagem, comparativamente à terapia convencional de vacas secas (CAMERON et al., 2015). Foram incluídas no estudo 729 vacas com baixa CCS (<200.000 células/ml) de 16 rebanhos, que foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos. A utilização do Petrifilm reduziu o uso de antibióticos na secagem, sem impactar negativamente a produção de leite ou aumentar a CCS na lactação subsequente.



### 3.3.4.1. Uso de Meios de Cultura Cromogênicos na CMF

Os meios de cultura cromogênicos possibilitam a diferenciação visual das colônias de espécies de microrganismos, de acordo com padrões de coloração específicas de cada patógeno. Nestes meios, as enzimas produzidas por determinado microrganismo promovem a formação de cromóforos e conseqüentemente a coloração do meio de cultura, possibilitando a diferenciação entre as espécies de interesse (GANDA et al., 2016). Os pigmentos produzidos através desta reação fixam-se aos patógenos de interesse, enquanto bactérias comensais, que não apresentam importância do ponto de vista clínico, são inibidas ou apresentam colônias incolores (PERRY, 2017).

Ferreira et al. (2018) compararam quatro métodos comerciais para uso em CMF, sendo três meios não cromogênicos com diferentes composições em placas de Petri (uma biplaca e duas quadriplacas) e um meio de cultura cromogênico. A eficácia dos métodos foi comparada por meio dos seguintes preditores: Ac, Se, Sp, VPP, VPN e coeficiente *Kappa*. O meio cromogênico apresentou valores superiores aos demais em todos os fatores preditivos testados e foi descrito como o método mais preciso para a identificação de patógenos causadores de mastite (FERREIRA et al., 2018).

Outro estudo avaliou a Sp, Se e Ac de três meios de cultura cromogênicos na identificação de patógenos causadores de MC em vacas leiteiras (GANDA et al., 2016). Este estudo comparou a eficácia dos meios cromogênicos com métodos de cultura tradicionais e utilizou sequenciamento do 16S rRNA como padrão ouro. Os resultados gerais obtidos para a identificação de microrganismos causadores de MC apontaram média geral de 82,3% de Se e 89,9% de Sp para os meios cromogênicos testados. Para *Staphylococcus aureus* a Se foi de 100% enquanto que a Sp foi de 99,8% (GANDA et al., 2016).

A capacidade dos meios cromogênicos de identificação de *Staphylococcus aureus* e diferenciá-lo de SCN também foi testada por Graber et al. (2013). O estudo avaliou a Se e Sp de 7 diferentes meios de cultura (sendo 2 meios cromogênicos) e do teste de coagulase na diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e SCN comparativamente ao método de identificação por PCR. Para isso, 206 isolados provenientes de casos de mastite, classificados como coco Gram-positivo catalase-positivo, foram inoculados nos diferentes meios e, após 24 h de incubação, passaram por avaliação visual por 2 indivíduos sem o conhecimento prévio do agente. Os resultados sugerem que os meios cromogênicos foram eficientes para discriminar *Staphylococcus aureus* de SCN. A colaboração entre a avaliação visual dos meios cromogênicos e a observação de hemólise no ágar sangue apresentou 100% de Se e Sp nos

dois meios cromogênicos testados. Considerando a boa capacidade dos meios cromogênicos para identificar patógenos causadores de mastite, esta metodologia tem alto potencial de uso para identificação microbiológica rápida em fazendas leiteiras.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, e seguiu as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o registro nº 4579250719.

##### **4.1. LOCAL, INSTALAÇÕES, SELEÇÃO DE VACAS E COLETA DE AMOSTRAS**

Para a obtenção das amostras de MSC e PP, foram selecionados 6 rebanhos comerciais nos estados de São Paulo ( $n = 5$ ) e Minas Gerais ( $N = 1$ ), com base em amostragem não probabilística de conveniência (disponibilidade em participar do estudo e na proximidade da instituição sede, Laboratório de Pesquisa em Qualidade de Leite – Qualileite Pirassununga, SP). Os rebanhos apresentavam em média  $125(\pm 60)$  vacas em lactação com média de produção de  $27,5 (\pm 2,5)$  litros/vaca/dia. Foram incluídos rebanhos com: a) sistema de registro de dados individuais dos animais (e.g., dias em lactação, número de lactações e produção de leite); b) rotina de identificação de MC (e.g., teste da caneca de fundo preto); c) análise mensal de CCS de todas as vacas em lactação.

Antes do início e nos dois primeiros meses do estudo, os ordenhadores e/ou responsáveis pela sanidade do úbere de cada rebanho foram treinados e acompanhados para padronizar procedimentos de coleta e reduzir o risco de contaminação das amostras (e.g., reduzir número de contaminação).

As amostras e leite foram coletadas a partir de vacas em lactação com mastite subclínica e vacas em PP. Para seleção das vacas em lactação com MSC, mensalmente, foram coletadas amostras compostas de leite de todas as vacas em lactação de cada rebanho para análise de CCS individual. Quinhentas e quatro vacas com  $CCS > 200.000$  células/mL (DÜRR et al., 2008; GONÇALVES et al., 2018a) foram selecionadas para coletas de amostras

composta de leite (*pool* de quartos mamários) para identificação microbiológica dos agentes causadores de MSC. Vacas com MC, doenças concomitantes que não mastite e as tratadas com antimicrobianos (sistêmicos ou intramamários) em período inferior a 14 dias foram excluídas do estudo.

Para as coletas de amostras de leite de PP, 541 vacas em PP ( $7 \pm 3$  dias após o parto) foram selecionadas em 4 fazendas leiteiras (4 das 6 fazendas incluídas no estudo) nos estados de São Paulo ( $n = 3$ ) e Minas Gerais ( $n = 1$ ). Foram coletadas amostras compostas de leite ou amostras individuais por quarto mamário, dependendo da rotina de coletas de amostras de cada fazenda, e foram excluídas aquelas que apresentaram MC, doenças concomitantes que não mastite e tratadas com antimicrobianos (sistêmicos ou intramamários) em período inferior a 14 dias.

Os procedimentos de coleta de amostras de leite para análise microbiológica foram realizados segundo NMC (2017). Antes da coleta, os tetos foram imersos em solução desinfetante, e decorridos 30 segundos, secos com papel-toalha descartável; os três primeiros jatos foram desprezados em caneca de fundo preto; a extremidade do teto foi desinfetada com álcool 70% iodado; as amostras foram coletadas diretamente em tubo estéril, mantendo-o inclinado para evitar riscos de contaminação; as amostras foram identificadas e transportadas ao laboratório em caixa isotérmica ( $\cong 4^{\circ}\text{C}$ ) ao laboratório onde foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. No caso das amostras PP, os procedimentos de coleta foram realizados por colaboradores de ordenha previamente treinados em cada rebanho, seguindo as recomendações do NMC (2017). Após as coletas, as amostras de leite de PP foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  na própria fazenda por um período máximo de 30 dias, até o transporte para o laboratório e análise de cultura microbiológica.

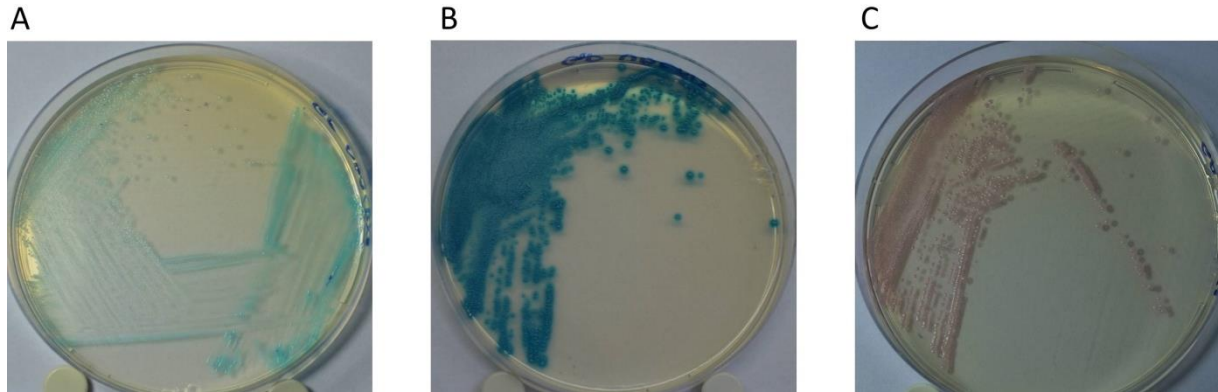
#### 4.2. MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS

Foram avaliados dois meios cromogênicos seletivos para identificação de bactérias Gram-positivas e *Staphylococcus* (CHROMagar™, Paris – França) em amostras de leite. Os resultados de identificação microbiológica presuntiva foram avaliados com base na interpretação visual das características de coloração das colônias, de acordo com a indicação do fabricante.

O meio de cultura Gram-Positivo (GP) é seletivo para o crescimento de bactérias Gram-positivas, cuja interpretação foi feita seguindo as recomendações do fabricante, de acordo com as seguintes colorações das colônias: a) azul turquesa – *Streptococcus*

*agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*; b) azul escuro/metálico – *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.; c) colônia rosada/rosa – *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

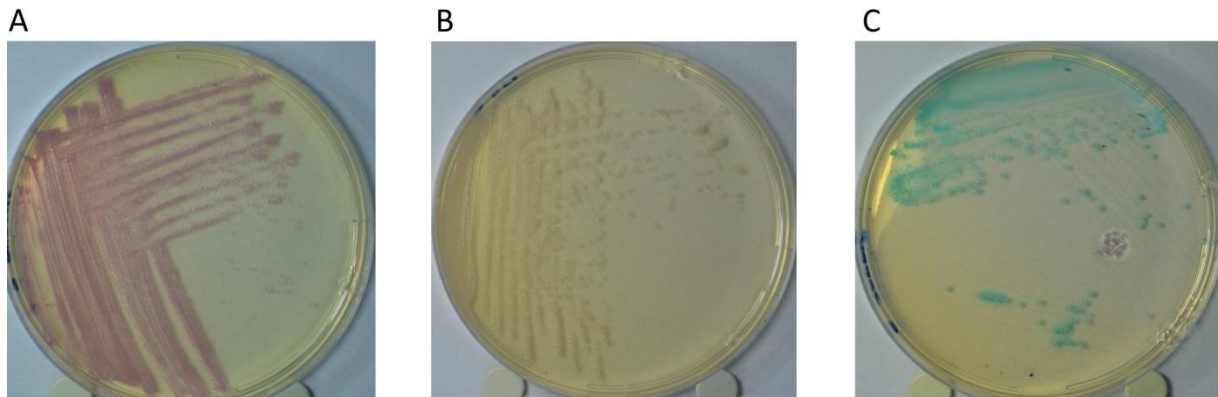
Figura 1: Colorações características de colônias de *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae* (A: azul turquesa); *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.(B: azul escuro/metálico); *Staphylococcus aureus* (C: rosa/rosado) com crescimento em meio de cultura Mastitis GP (CHROMagar™, Paris – França).



Fonte: Garcia, 2021

O meio de cultura *Staphylococcus* (S) é seletivo para o crescimento de *Staphylococcus*, e foi interpretado com base na coloração das colônias seguindo as recomendações do fabricante: a) rosa – *Staphylococcus aureus*; b) colônia incolor/rosada – *Staphylococcus epidermidis*; c) azul turquesa – *Staphylococcus saprophyticus* (Figura 2). Em ambos os meios de cultura, quaisquer colônias classificadas com outras cores não descritas nas recomendações do fabricante foram classificadas como “outros microrganismos”. A leitura das colônias nas placas dos meios de cultura cromogênicos para a identificação das colônias bacterianas foi feita em fundo branco para melhor diferenciação da coloração das colônias. Todas as placas inoculadas foram fotografadas para registro.

Figura 2: Colorações características de colônias de *Staphylococcus aureus*.(A: rosa); *Staphylococcus epidermidis* (B: incolor/rosada); *Staphylococcus saprophyticus* (C: azul turquesa) com crescimento em meio de cultura Staphylococcus (CHROMagar™, Paris – França).



Fonte: Garcia, 2021

No meio cromogênico GP, amostras foram consideradas positivas para *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. ou *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae* quando apresentaram crescimento de  $\geq 3$  colônias com o padrão de cores definidos para as espécies. No caso de *Staphylococcus aureus*, o crescimento de  $\geq 1$  colônia foi considerado para a identificação do agente. Já no meio de cultura S, para todos os agentes, a amostra foi considerada positiva quando houve o crescimento de  $\geq 1$  colônia.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

As amostras de leite coletadas para identificação microbiológica foram inoculadas (0,01 mL) simultaneamente em três meios de cultura: a) ágar sangue suplementado com 5% de sangue bovino; b) meio cromogênico GP e c) meio cromogênico S. Após inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e em seguida passaram por avaliação visual do crescimento/coloração das colônias de microrganismos. Após a incubação, foram avaliadas as seguintes características nas placas com ágar sangue: a) número de colônias; b) coloração; c) tamanho; e d) presença de hemólise. Amostras com  $>3$  tipos diferentes de microrganismos (tanto em ágar sangue quanto nos meios cromogênicos) foram consideradas contaminadas (PARKER et al., 2008), enquanto amostras com isolamento de 2 microrganismos diferentes foram consideradas “cultura mista”. Nos meios cromogênicos, as colorações das colônias foram analisadas para a realização da identificação microbiológica, segundo as

recomendações do fabricante (Figura 1 e Figura 2). A inspeção do crescimento microbiano nos meios de cultura foi realizada pelo mesmo avaliador durante todo o período experimental, o qual não tinha conhecimento prévio dos resultados de identificação por MALDI-TOF MS dos isolados.

As colônias microbianas identificadas visualmente nos meios de cultura cromogênicos e ágar sangue foram avaliadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS), o qual foi considerado como método padrão de identificação microbiológica. Os resultados de identificação bacteriana presuntiva nos meios cromogênicos foram analisados quanto à Se, Sp, Ac, VPP e VPN. O coeficiente *Kappa* de Cohen (*K*) foi utilizado para avaliar a intensidade da concordância entre os resultados dos meios de cultura analisados e o método padrão de identificação microbiológica.

#### 4.4. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MALDI-TOF MS

Todos os isolados bacterianos obtidos nos meios de cultura ágar sangue e nos meios cromogênicos GP e S foram submetidos à identificação bacteriana por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS), de acordo com (BARCELOS et al., 2019). As colônias foram transferidas, com auxílio de hastes de madeira estéreis, para *spots* individuais em placa MSP 96-spot (Bruker Daltonics Inc.). Foi realizada extração proteica das amostras por pipetagem de 1 µL de ácido fórmico em cada *spot*. Após secagem da placa em temperatura ambiente, 1 µL de solução saturada de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila, 47,5% de água e 2,5% de ácido trifluoroacético) foi pipetado sobre cada *spot* da placa. Além disso, solução contendo o padrão de teste bacteriano (BST, Bruker Daltonics Inc.) foi pipetada em um *spot* individual para a calibração do equipamento.

As placas com amostras dos isolados bacterianos foram analisadas no equipamento de MALDI-TOF MS (Microflex LT Bruker) para aquisição de espectros de massa gerados a partir de aproximadamente 250 disparos de laser emitidos aleatoriamente sobre as amostras. A captação e avaliação dos espectros foi realizada pelo software Flex Control (versão 3.4) de forma automática, gerando um “*fingerprint*” (conjunto de picos proteicos), que foi comparado ao banco de dados do software MBT Compass (MALDI BioTyper® Compass, versão 4.1.7, User Manual, Bruker Daltonics Inc.) para identificação e classificação dos espectros. O grau de similaridade entre o espectro da amostra e o banco de dados de referência foi interpretado segundo a recomendação do fabricante (Bruker Daltonics Inc.). Foi considerado como

identificação em nível de: espécie (score da amostra >2); gênero (>1,7 e <2); e sem identificação confiável (<1.7). Os isolados que apresentarem score de identificação >2 foram criopreservados (-80°C) em meio *brain heart infusion* (BHI) suplementado com glicerina 10%.

Isolados de patógenos de interesse (*Staphylococcus aureus*; *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp; *Streptococcus agalactiae*/*dysgalactiae*; *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*) inicialmente não identificados por MALDI-TOF MS foram submetidos à nova análise, e em última instância à nova inoculação nos três meios de cultura para a realização de novo procedimento de análise por MALDI-TOF. Nos casos de agentes classificados como “outros microrganismos” isolados nos meios GP e/ou S que não apresentaram identificação por MALDI-TOF MS após segunda análise, realizou-se identificação por microbiologia convencional, cujos resultados foram utilizados apenas a determinação das frequências de isolamentos. As amostras sem identificação de microrganismos pela MALDI-TOF MS não foram incluídos na avaliação estatística do desempenho dos meios cromogênicos, visto que os agentes classificados como “outros microrganismos” não são identificados pelos meios de cultura testados e não foram usados para os cálculos dos preditores de desempenho.

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

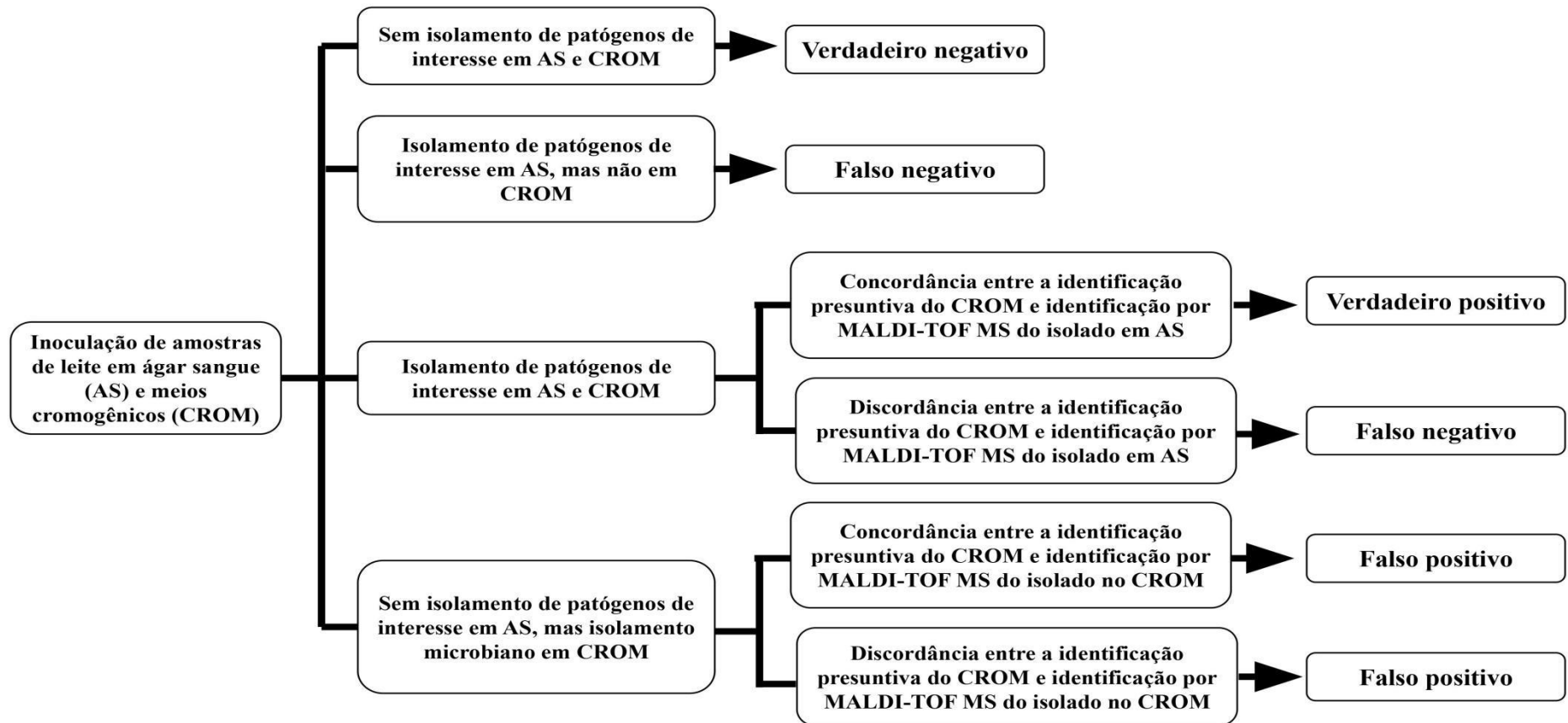
A identificação visual presuntiva dos agentes causadores de mastite pelos meios cromogênicos GP e S foi comparada à identificação microbiológica dos isolados em AS por MALDI-TOF MS para estimativa dos indicadores de desempenho diagnóstico (Figura 3). Todos os microrganismos isolados do ágar sangue e dos meios cromogênicos GP e S foram submetidos à identificação por MALDI-TOF MS para comparação dos resultados. Amostras com contaminação em um dos dois resultados (ágar sangue e/ou meios cromogênicos) foram excluídas na análise final dos resultados.

Foram calculados Ac, Se, Sp, VPP e VPN dos meios cromogênicos baseados nos seguintes resultados: Verdadeiro Positivo (VP; quando houve crescimento microbiano e o resultado de identificação microbiológica visual dos meios cromogênicos foi correspondente ao da metodologia padrão), Verdadeiro Negativo (VN; quando não houve crescimento de microrganismos em ambos meios de cultura cromogênico e ágar sangue), Falso Positivo (FP; quando houve crescimento de qualquer microrganismo cujo resultado teve discordância entre a identificação microbiológica da metodologia padrão e a identificação visual dos meios

cromogênicos), Falso Negativo (FN; quando não houve crescimento de microrganismos nos meios cromogênicos e houve crescimento de qualquer microrganismo no método padrão) (GANDA et al., 2016; FERREIRA et al., 2018).



Figura 3: Comparação entre os resultados de identificação microbiológica presuntiva dos meios de cultura cromogênicos GP e Staphylococcus (CHROMagar™, Paris – França) e a identificação microbiológica por MALDI-TOF MS dos isolados em ágar sangue (teste padrão) para determinação dos resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos e posterior avaliação do desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos para amostras de mastite subclínica e leite de vacas em pós-parto



Os resultados dos preditores Se e Sp foram obtidos por meio das seguintes fórmulas:

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

Se: Sensibilidade.  
 VP: Número de verdadeiros positivos.  
 FN: Número de falsos negativos.

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

Sp: Especificidade.  
 VN: Número de verdadeiros negativos.  
 FP: Número de falsos positivos.

Os resultados dos preditores VPP e VPN foram obtidos aplicando-se as seguintes fórmulas:

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

VPP: Valor preditivo positivo.  
 VP: Número de verdadeiros positivos.  
 FP: Número de falsos positivos.

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

VPP: Valor preditivo positivo.  
 VN: Número de verdadeiros negativos.  
 FN: Número de falsos negativos.

Para a obtenção dos resultados de Ac foi aplicada a seguinte fórmula:

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

Ac: Acurácia.  
 VP: Número de verdadeiros positivos.  
 VN: Número de verdadeiros negativos.  
 N: Número total de amostras analisadas.

Foi utilizada a opção SENSPAC do PROC FREQ do SAS versão 9.4 (SAS INC., Carolina do Norte, EUA) para cálculo da Se, Sp, VPP e VPN. A Ac foi calculada também pelo PROC FREQ, considerando-se a soma dos resultados VP e VN. Os resultados de Ac, Se, Sp, VPP e VPN da identificação microbiológica dos meios de cultura cromogênicos foram

classificados como: baixos (resultados <60%), intermediários (entre 60% e 80%) e elevados (>80%) (ROYSTER et al., 2014).

O coeficiente  $K$  foi calculado para avaliar a concordância dos resultados de identificação microbiológica dos meios testados à identificação microbiológica da metodologia MALDI-TOF MS. Os resultados obtidos variam em uma escala de 0 a 1, na qual resultados iguais a 1 indicam 100% de concordância. Para cálculo do coeficiente de concordância aplicou-se a seguinte fórmula:

$$K = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

$K$ : Coeficiente Kappa de Choen.

$p_o$ : Taxa de aceitação relativa.

$p_e$ : Taxa de aceitação hipotética.

Os resultados do coeficiente de concordância  $K$  foram calculados pelo PROC FREQ do SAS (2009). Coeficientes entre 0,81 e 1 foram considerados concordância quase perfeita; resultados de 0,61 a 0,8 indica concordância substancial; de 0,41 a 0,6 indica moderada concordância e valores entre 0,21 a 0,4 indica teste falho (FERREIRA et al., 2018).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO

Um total de 504 amostras compostas de leite provenientes de casos de MSC foi avaliado durante os períodos de 01/02/2019 a 15/03/2019. Deste total, foram identificadas 52 diferentes espécies, considerando os resultados de isolamento obtidos para os três meios de cultura avaliados, dado que os microrganismos isolados em cada meio não são necessariamente equivalentes para a mesma amostra. Não houve contaminações dentre as amostras de MSC.

Em ágar sangue, 38,7% (195/504) das amostras de MSC apresentaram ausência de isolamento microbiano e 3,8% (19/504) apresentaram cultura mista (e.g., isolamento de >1 tipo de microrganismo; Tabela 1). Bactérias Gram-positivas apresentaram maior frequência de isolamento (57,1%; 288/504); enquanto as Gram-negativas apresentaram 3,4% (17/504). Dentre as bactérias Gram-positivas isoladas em ágar sangue, *Staphylococcus não-aureus* (SNA) foi o grupo de microrganismos com maior frequência de isolamento (25,2%; 127/504),

sendo que *Staphylococcus chromogenes* foi o patógeno mais frequentemente isolado (20,6%; 104/504) em amostras de MSC.

No meio cromogênico GP, 49,4% (249/504) apresentaram isolamento microbiano e 5,2% (26/504) apresentaram isolamento de cultura mista. Adicionalmente, 4,8 (24/504) das amostras com isolamento microbiológico no meio cromogênico GP não tiveram crescimento em ágar sangue. Das amostras de MSC com isolamento microbiano no meio GP, *Staphylococcus chromogenes* apresentou maior frequência de isolamento (16,5%; 83/504), seguido por *Streptococcus uberis* (13,7%; 69/504) e *Streptococcus agalactiae* (6,7%; 34/504).

Para o meio cromogênico S, 32,7% (165/504) apresentaram isolamento microbiano nas amostras de MSC e 2,2% (11/504) apresentaram isolamento de cultura microbiológica mista. Ademais, 5,6% (28/504) das amostras sem crescimento em ágar sangue apresentaram isolamento microbiológico no meio cromogênico S. *Staphylococcus chromogenes* foi o patógeno mais isolado (19,4%; 98/504), seguido por *Staphylococcus aureus* (4,0%; 20/504). Adicionalmente, *Streptococcus uberis* foi isolado em 0,4% (2/504) das amostras no meio S. Colônias de *Streptococcus uberis* identificadas no meio S e as respectivas amostras de leite foram re-inoculadas em placas do meio S e não foi observado isolamento microbiano.

Tabela 1: Frequência de isolamento de agentes causadores de mastite isolados a partir de amostras de mastite subclínica inoculadas nos meios de cultura: ágar sangue, Mastitis GP e *Staphylococcus*, identificados através da metodologia MALDI-TOF MS.

	AS <sup>1</sup>	%	GP <sup>2</sup>	%	S <sup>3</sup>	%
<b>Total de amostras</b>	504	100	504	100	504	100
Cultura negativa	195	38,7	255	50,6	339	67,3
Cultura positiva	309	61,3	249	49,4	165	32,7
Colônias com uma única morfologia	290	57,5	223	44,2	154	30,6
Cultura mista <sup>4</sup>	19*	3,8	26**	5,2	11**	2,2
Amostras contaminadas <sup>5</sup>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>Gram-positivas</b>	288	57,1	247	49,0	165	32,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	25	5,0	34	6,7	0	0,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	21	4,2	16	3,2	0	0,0
<i>Streptococcus uberis</i>	61	12,1	69	13,7	2	0,4
<i>Enterococcus</i> spp.	2	0,4	4	0,8	0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	4,0	20	4,0	20	4,0
<b>SNA<sup>6</sup></b>	127	25,2	102	20,2	124	24,6
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	104	20,6	83	16,5	98	19,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,2	0	0,0	2	0,4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,2	0	0,0	0	0,0
Outros SNA	22	4,4	22	4,4	29	5,8
Outros Gram-positivos	49	9,7	25	5,0	24	4,8
<b>Gram-negativas</b>	17	3,4	0	0,0	0	0,0
<b>Outros Patógenos</b>	5	1	2	0,4	0	0,0

<sup>1</sup> Ágar sangue

<sup>2</sup> Mastitis GP (CHROMaga™, Paria – França)

<sup>3</sup> *Staphylococcus* (CHROMagar™, Paris – França)

<sup>4</sup> Colônias com duas morfologias distintas

<sup>5</sup> Colônias com mais do que duas morfologias diferentes

<sup>6</sup> *Staphylococcus* não *aureus*

<sup>4\*</sup> *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* (n = 1); *S. agalactiae* e outros Gram-positivos (n = 1); *S. agalactiae* e *S. chromogenes* (n = 1); *S. aureus* e *S. agalactiae* (n = 1); *S. aureus* e *S. chromogenes* (n = 1); *S. dysgalactiae* e SNA (n = 1); *Enterococcus* spp. e *S. chromogenes* (n = 1); Gram-negativa e *S. chromogenes* (n = 1); Outros Gram-positivos e *S. chromogenes* (n = 3); *S. chromogenes* e SNA (n = 1); *S. uberis* e *S. aureus* (n = 1); *S. uberis* e *S. chromogenes* (n = 3) *S. uberis* e *S. epidermidis* (n = 1); *S. uberis* e SNA (n = 2).

<sup>4\*\*</sup> *S. agalactiae* e Outros Gram-positivos (n = 1); *S. agalactiae* e *S. chromogenes* (n = 1); *S. agalactiae* e *S. uberis* (n = 1); *S. agalactiae* e *S. aureus* (n = 2); *S. aureus* e *Enterococcus* spp. (n = 1); *S. aureus* e *S. chromogenes* (n = 2); *S. aureus* e *S. uberis* (n = 4); *S. dysgalactiae* e *S. chromogenes*; (n = 1); *Enterococcus* spp. e *S. chromogenes* (n = 2); *S. chromogenes* e Outros Gram-positivos (n = 4); *S. uberis* e *S. dysgalactiae* (n = 1); *S. uberis* e *S. chromogenes* (n = 1); *S. chromogenes* e SNA (n = 3); Outros Gram-positivos e SNA (n = 2).

<sup>4\*\*\*</sup> *S. aureus* e Outros Gram-positivos (n = 3); *S. aureus* e *S. chromogenes* (n = 1); *S. aureus* e SNA (n = 1); *S. chromogenes* e SNA (n = 3); *S. epidermidis* e SNA (n = 2); Outros Gram-positivos e Outros Gram-positivos (n = 1);

Quanto às amostras de leite provenientes de vacas em PP, um total de 541 amostras (226 compostas e 315 de quartos mamários) foi analisado durante o período de 12/04/2019 a 25/07/2019. Um total de 37 diferentes espécies de microrganismos foram isoladas, considerando os 3 meios de cultura avaliados. Em 0,9% das amostras (5/541; 4 amostras

compostas e 1 de quarto mamário) foram consideradas contaminadas (e.g., isolamento de colônias com mais de 2 morfologias diferentes), e foram excluídas da avaliação estatística.

Em ágar sangue, 30,5% (165/541) das amostras de vacas em PP apresentaram isolamento microbiano e 2,4% (13/541) apresentaram cultura mista. Bactérias Gram-positivas foi o grupo de microrganismos com maior frequência de isolamento (28,3%; 153/541). Dentre as bactérias Gram-positivas, SNA foi o grupo com maior frequência de isolamento (19,6% 106/541), sendo que *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie mais frequentemente isolada (15,5%; 84/541; Tabela 2).

No meio de cultura GP, do total de amostras de PP analisadas, 13,3% (72/541) apresentaram isolamento microbiano, e 0,5 (3/541) obtiveram crescimento de dois agentes diferentes. Do total de amostras de PP, 0,6% (3/541) apresentaram crescimento no meio cromogênico GP, mas sem crescimento em ágar sangue. O patógeno mais frequentemente isolado foi *Staphylococcus chromogenes* (7,2%; 39/541), seguido por *Staphylococcus aureus* (0,9%; 5/541) e *Streptococcus dysgalactiae* com (1,1%; 6/541) de isolamento nas amostras de PP.

Já no meio cromogênico S, do total de amostras de PP analisadas, 5,5% (30/541) apresentaram isolamento microbiano, e destas, 0,5% (3/541) apresentaram cultura mista. Quatro amostras (0,7%; 4/541) apresentaram crescimento no meio cromogênico S sem que o mesmo ocorresse em ágar sangue. *Staphylococcus chromogenes* foi o patógeno mais isolado no meio S em amostras de PP (2,0%; 11/541), seguido por *Staphylococcus aureus* (0,9%; 5/541; Tabela 2).

Tabela 2: Frequência de isolamento de agentes causadores de mastite isolados a partir de amostras de leite de vacas em pós-parto inoculadas nos meios de cultura: ágar sangue Mastitis GP e *Staphylococcus*, identificados através da metodologia MALDI-TOF MS.

	AS <sup>1</sup>	%	GP <sup>2</sup>	%	S <sup>3</sup>	%
<b>Total de amostras</b>	541	100	541	100	541	100
<b>Cultura negativa</b>	371	68,6	464	85,7	506	93,5
Cultura positiva	165	30,5	72	13,3	30	5,5
Colônias com um único tipo de morfologia	152	28,1	69	12,7	27	5,0
Cultura mista <sup>4</sup>	13*	2,4	3**	0,5	3***	0,5
Contaminadas <sup>5</sup>	5	0,9	5	0,9	5	0,9
<b>Gram-positivas</b>	153	28,3	71	13,1	30	5,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7	1,3	6	1,1	0	0,0
<i>Streptococcus uberis</i>	4	0,7	4	0,7	0	0,0
<i>Enterococcus</i> spp.	2	0,4	2	0,4	0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	1,1	5	0,9	5	0,9
<b>SNA<sup>6</sup></b>	106	19,6	48	8,9	20	3,7
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	84	15,5	39	7,2	11	2,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	0,7	2	0,4	1	0,2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Outros SNA	38	7,0	9	1,7	9	1,7
Outros Gram-positivos	18	3,3	6	1,1	6	1,1
<b>Gram-negativas</b>	11	2,0	0	0,0	0	0,0
<b>Outros Patógenos</b>	1	0,2	1	0,2	0	0,0

<sup>1</sup> Ágar sangue

<sup>2</sup> Mastitis GP (CHROMagar™, Paria – França)

<sup>3</sup> *Staphylococcus* (CHROMagar™, Paris – França)

<sup>4</sup> Colônias com duas morfologias distintas

<sup>5</sup> Colônias com mais do que duas morfologias distintas

<sup>6</sup> *Staphylococcus* não *aureus*

\*\* *S. chromogenes* e Outros Gram-positivos (n = 3); *S. chromogenes* e SNA (n = 3); *Streptococcus dysgalactiae* e *S. chromogenes* (n = 1); *Streptococcus dysgalactiae* e SNA (n = 1); *S. epidermidis* e *S. chromogenes* (n = 1); SNA e SNA (n = 3); *S. uberis* e SNA (n = 1).

\*\*\* *S. chromogenes* e Outros Gram-positivos (n = 1); *S. chromogenes* e SNA (n = 1); SNA e SNA (n = 1).

\*\*\*\* *S. aureus* e Outros Gram-positivos (n = 1); *S. chromogenes* e SNA (n = 1); SNA e SNA (n = 1).

## 5.2. DESEMPENHO DIAGNÓSTICO

Os meios de cultura cromogênicos foram avaliados quanto ao desempenho para identificação dos agentes causadores de mastite comparativamente à metodologia MALDI-TOF MS. Para cálculo dos preditores de desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos, considerou-se apenas a frequência de isolamento dos microrganismos em ágar sangue (identificados por MALDI-TOF MS), em comparação à identificação visual

presuntiva dos meios cromogênicos. A identificação por MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos meios cromogênicos não foi considerada neste cálculo.

A respeito dos grupos de patógenos com cores características (segundo as recomendações do fabricante) em meio GP, *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. (12,5%; 63/504) foi o grupo de microrganismos com maior frequência de isolamento em amostras de MSC, seguido por *Streptococcus agalactiae/Streptococcus dysgalactiae* (9,1%; 46/504) e *Staphylococcus aureus* (4,0%; 20/504; Tabela 3). Também foram isolados 34,7% (175/504) bactérias Gram-positivas classificadas como “outros microrganismos”, que apresentaram padrão de cores inespecíficas, não pertencentes ao conjunto de microrganismos identificados pelo meio GP. Não houve crescimento em 50,9% (256/504) das amostras de MSC no meio GP.

Em amostras de MSC, a Ac de identificação do meio cromogênico GP variou de acordo com o tipo de patógeno de 92,3% (*Streptococcus uberis/Enterococcus* spp) a 95,6% (*Streptococcus agalactiae/Streptococcus dysgalactiae*). Adicionalmente, a Se da identificação microbiológica do meio GP variou de acordo com o grupo de patógenos, de 25,0% (*Staphylococcus aureus*) a 90,5% (*Streptococcus uberis/Enterococcus* spp), enquanto a Sp variou de 92,5% (*Streptococcus uberis/Enterococcus* spp) a 98,3% (*Staphylococcus aureus*). Os resultados de VPP de identificação do meio GP variaram, de acordo com o tipo de patógeno, de 38,5% (*Staphylococcus aureus*) a 70,7% (*Streptococcus agalactiae/Streptococcus dysgalactiae*), enquanto os valores de VPN variaram de 96,9% (*Staphylococcus aureus*) a 98,9% (*Streptococcus agalactiae/Streptococcus dysgalactiae*; Tabela 3).

O índice de concordância  $K$  entre os resultados de identificação bacteriana pelo meio GP e o método padrão variou de acordo com o tipo de patógeno de 0,30 (*Staphylococcus aureus*) a 0,76 (*Streptococcus agalactiae/Streptococcus dysgalactiae*; Tabela 3) em amostras de MSC. Os resultados obtidos para isolados classificados como “outros microrganismos” provenientes das amostras de MSC no meio cromogênico GP apresentaram Ac de 77,0%, Se de 49,1%, Sp de 91,8%, VPP de 76,1%, VPN de 77,2% e coeficiente de concordância  $K = 0,45$ .



Tabela 3: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico Gram-positivo em amostras de leite de vacas com mastite subclínica (n = 504).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i> / <i>Enterococcus spp</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Outros microrganismos
Frequência <sup>1</sup> (n)	20	63	46	175
Ac% <sup>2</sup>	95,4 (93,6 - 97,3)	92,3 (89,9 - 94,6)	95,6 (93,9 - 97,4)	77,0 (73,3 – 80,7)
Se% <sup>3</sup>	25,0 (6 - 44)	90,5 (83,2 - 97, 7)	89,1 (80,1 - 98,1)	49,1 (41,7 – 56,6)
Sp% <sup>4</sup>	98,3 (97,2 - 99,5)	92,5 (90 - 95)	96,3 (94,6 - 98)	91,8 (88,8 – 94,8)
Vpp% <sup>5</sup>	38,5 (12 - 64,9)	63,3 (53,4 - 73,3)	70,7 (59 - 82,4)	76,1 (68,2 – 84,0)
Vpn% <sup>6</sup>	96,9 (95,4 - 98,5)	98,5 (97,4 - 99,7)	98,9 (97,9 - 99,9)	77,2 (73,1 – 81,4)
K(IC 95%) <sup>7</sup>	0,30 (0,09-0,5)	0,71 ( 0,61 – 0,79)	0,76 (0,61 – 0,79)	0,45(0,36 – 0,53)
K valor de P <sup>8</sup>	0,0495	<.0001	0,0105	<.0001

<sup>1</sup> Frequência de isolamento em números absolutos

<sup>2</sup> Acurácia em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>3</sup> Sensibilidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>4</sup> Especificidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>5</sup> Valor preditivo positivo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>6</sup> Valor preditivo negativo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>7</sup> IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen.

<sup>8</sup> Valor de P do Coeficiente *Kappa* de Cohen, K.

Quanto ao meio cromogênico S, com base nos resultados de identificação presuntiva, *Staphylococcus aureus* foi o patógeno com maior frequência de isolamento (4,0%; 20/504), seguido por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* ambos com 0,2% (1/504), quando se considera apenas os resultados de isolados bacterianos obtidos no ágar sangue das amostras de MSC analisadas. Também, foram isolados em ágar sangue 25% (126/504) microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. que não faziam parte de nenhuma das espécies diferenciadas pelo meio S, e foram classificados como “outros microrganismos”. Além disso, 38,9% (196/504) das amostras de MSC não tiveram crescimento no meio S após a incubação.

Devido à baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*, não foi possível avaliar o desempenho do meio S para identificação microbiológica destes agentes em amostras de MSC. Contudo, na identificação de *Staphylococcus aureus* o meio cromogênico S obteve Ac de 98,0%, Se de 80,0%, Sp de 98,8%, VPP de 72,7% e VPN de 99,2%. O percentual de concordância entre a identificação de *Staphylococcus aureus* pelo meio cromogênico S e a identificação microbiológica pelo método padrão, expresso pelo coeficiente *Kappa* foi de 0,73 (Tabela 4). Nas amostras de MSC com crescimento de agentes classificados como “outros *Staphylococcus*” no meio S, a Ac foi de 79,8%, a Se foi de 61,1%, a Sp foi de 86,0%, VPP foi de 59,2%; VPN foi de 86,9% e o coeficiente de concordância *K* = 0,46.

Tabela 4: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico *Staphylococcus* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica (n = 504).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<b>Outros <i>Staphylococcus</i></b>
Frequência <sup>1</sup> (n)	20	1	1	126
Ac% <sup>2</sup>	98,0 (96,8 - 99,2)	98,6 (97,6 - 99,6)	96,2 (94,6 - 97,9)	79,8 (76,3 – 83,3)
Se% <sup>3</sup>	80,0 (62,5 - 97,5)	0 (.)	0 (.)	61,1 (52,6 – 69,6)
Sp% <sup>4</sup>	98,8 (97,8 - 99,8)	98,8 (.)	96,4 (.)	86,0 (82,5 – 89,5)
Vpp% <sup>5</sup>	72,7(54,1 - 91,3)	0 (.)	0 (.)	59,2 (50,8 – 67,7)
Vpn% <sup>6</sup>	99,2 (98,4 – 100)	99,8 (.)	99,8 (.)	86,9 (83,5 -90,3)
K (IC 95%) <sup>7</sup>	0,73 (0,56 – 0,89)	(-0,003) ((-0,008) – 0,002)	(-0,004) ((-0,010)- 0,003)	0,46 (0,37 – 056)
K valor de P <sup>8</sup>	0,5271	0,1797	0,0067	<.0001

<sup>1</sup> Frequência de isolamento em números absolutos

<sup>2</sup> Acurácia em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>3</sup> Sensibilidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>4</sup> Especificidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>5</sup> Valor preditivo positivo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>6</sup> Valor preditivo negativo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>7</sup> IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen.

<sup>8</sup> Valor de P do Coeficiente *Kappa* de Cohen, K.

Nas amostras de PP, *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae* foi o grupo de patógenos com maior frequência de isolamento em amostras de leite de vacas em PP pelo meio GP, (1,3%; 7/536), já *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp apresentaram ambos frequência de isolamento de 1,1% (6/536) em ágar sangue. Isolados categorizados como “outros microrganismos” apresentaram frequência de isolamento de 25,6% (137/536), e 81,2% (435/536) das amostras não apresentaram isolamento.

A Ac do meio cromogênico GP variou de acordo com o grupo de patógenos de 98,9% (*Staphylococcus aureus*) a 99,6% (*Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.) para amostras de leite de vacas em PP (Tabela 5). Adicionalmente, foi observada Se de 100% para *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp., enquanto que para *Staphylococcus aureus* o meio GP apresentou Se de 50%. Os valores de Sp variaram de 99,0% (*Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*) a 99,6% (*Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.). Observou-se variação de 50,0% de VPP (*Staphylococcus aureus*) a 66,7 (*Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp.), enquanto os valores de VPN variaram de 99,4% (*Staphylococcus aureus*) a 100% (para os grupos *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*). O valor do coeficiente *Kappa* do meio cromogênico GP variou entre patógenos, de 0,49 para *Staphylococcus aureus* a 0,72 para *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp. (Tabela 5). Amostras de PP com isolamento de “outros microrganismos” apresentaram Ac de 81,1%, Se de 32,9%, Sp de 98,8%, VPP de 90,0%, VPN de 81,1% e *K* de 0,40 no meio GP.

Tabela 5: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, *K* do meio cromogênico Gram-positivo em amostras de leite de vacas em pós-parto (n = 536).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis/ Enterococcus spp</i>	<i>Streptococcus agalactiae/ dysgalactiae</i>	Outros microrganismos
Frequência <sup>1</sup> (n)	6	6	7	137
Ac% <sup>2</sup>	98,9 (98 - 99,8)	99,6 (99,1 - 100)	99,1 (98,3 - 99,9)	81,9 (78,6 – 85,2)
Se% <sup>3</sup>	50,0 (10 - 90)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	32,9 (25,0 – 40,7)
Sp% <sup>4</sup>	99,4 (98,8 - 100)	99,6 (99,1 - 100)	99,0 (98,2 - 99,9)	98,8 (97,7 – 99,8)
Vpp% <sup>5</sup>	50,0(10 - 90)	66,7 (29 - 100)	58,3 (30,4 - 86,2)	90,0 (81,7 – 98,3)
Vpn% <sup>6</sup>	99,4 (98,8 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	81,1 (77,6 – 84,6)
<i>K</i> (IC 95%) <sup>7</sup>	0,49 (0,14 – 0,84)	0,72 (0,42 - 1)	0,69 (0,46 – 0,93)	0,40 (0,31 – 0,49)
<i>K</i> valor de P <sup>8</sup>	1	0,5637	0,0143	<.0001

<sup>1</sup> Frequência de isolamento em números absolutos

<sup>2</sup> Acurácia em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>3</sup> Sensibilidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>4</sup> Especificidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>5</sup> Valor preditivo positivo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>6</sup> Valor preditivo negativo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>7</sup> IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen.

<sup>8</sup> Valor de P do Coeficiente *Kappa* de Cohen, *K*.

Quanto às amostras de PP no meio cromogênico S, 92,0% foram negativas. De forma semelhante ao observado em MSC, a frequência de isolamento dos patógenos *Staphylococcus saprophyticus* (0%; 0/536) e *Staphylococcus epidermidis* (0,75%; 4/536) foi insuficiente para a avaliação do desempenho do meio cromogênico S na detecção destes agentes. Entretanto, *Staphylococcus aureus* apresentou frequência de isolamento de 1,1% (6/536), e 22,2% (119/536) das amostras tiveram isolamento de agentes classificados como “outros microrganismos”.

O meio cromogênico S apresentou 99,6% de Ac, 66,7% de Se e 100% de Sp para *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de vacas em PP (Tabela 6). Adicionalmente, o meio S apresentou VPP de 100%, VPN de 99,6% e coeficiente  $K$  de 0,80 na identificação de *Staphylococcus aureus*. Os preditores diagnóstico do meio S para “outros *Staphylococcus* nas amostras de PP foram: Ac = 78,7%, Se = 10,9%, Sp = 98,1%, VPP = 61,9%, VPN = 79,4% e o coeficiente de concordância  $K = 0,13$ .

Tabela 6: Frequência de isolamento de microrganismos e desempenho: acurácia; sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo e coeficiente de concordância *Kappa* de Cohen, K do meio cromogênico *Staphylococcus* em amostras de leite de vacas em pós-parto (n = 536).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Outros <i>Staphylococcus</i>
Frequência <sup>1</sup> (n)	6	4	0	119
Ac% <sup>2</sup>	99,6 (99,1 - 100)	99,3 (98,5 - 100)	98,9 (98 - 99,8)	78,7 (75,3 – 82,2)
Se% <sup>3</sup>	66,7 (29 - 100)	25,0 (0 - 67,4)	.	10,9 (5,3 – 16,5)
Sp% <sup>4</sup>	100 (100 - 100)	99,8 (99,4 - 100)	98,9 (.)	98,1 (96,8 – 99,4)
Vpp% <sup>5</sup>	100 (100 - 100)	50,0 (0 - 100)	0,00 (.)	61,9 (41,1 – 82,7)
Vpn% <sup>6</sup>	99,6 (99,1 - 100)	99,4 (98,8 - 100)	100 (.)	79,4 (75,9 – 82,9)
K (IC 95%) <sup>7</sup>	0,80 (0,52 – 1,00)	0,33 ((-0.16) - 0.82)	0	0,13 (0,05 – 0,20)
K valor de P <sup>8</sup>	0,1573	0,3173	.	<.0001

<sup>1</sup> Frequência de isolamento em números absolutos

<sup>2</sup> Acurácia em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>3</sup> Sensibilidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>4</sup> Especificidade em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>5</sup> Valor preditivo positivo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>6</sup> Valor preditivo negativo em porcentagem; intervalo de confiança (valor entre parênteses).

<sup>7</sup> IC = intervalo de confiança 95% - Teste de concordância *Kappa* de Cohen.

<sup>8</sup> Valor de P do Coeficiente *Kappa* de Cohen, K.

## 6. DISCUSSÃO

Meios de cultura cromogênicos são alternativas de identificação microbiológica rápida nas fazendas e que permitem diferenciar presuntivamente espécies e/ou grupos bacterianos (PERRY, 2017). Este estudo avaliou a capacidade de identificação rápida de agentes causadores de mastite dos meios de cultura cromogênicos GP e S em amostras de MSC e amostras de leite de vacas em PP.

Considerando os patógenos/grupos de patógenos passíveis de identificação presuntiva pelos meios de cultura cromogênicos para as amostras de MSC, o grupo *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp apresentou maior frequência de isolamento (N = 63), seguido por *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* (N = 46) e *Staphylococcus aureus* (N = 20). Resultados similares foram observados em outros estudos avaliando o desempenho de métodos de identificação rápida de agentes causadores de mastite frente a amostras de MC (GANDA et al., 2016; GRIFFIOEN et al., 2018) e MSC (ROYSTER et al., 2014; VIORA et al., 2014).

Nas amostras PP, dentre os patógenos/grupos de patógenos os quais o meio GP se propõe a identificar, o grupo *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* apresentou o maior número de isolamentos (N = 7), seguido por *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp (N = 6) e *Staphylococcus aureus* (N = 6). Em ambos os tipos de amostras o grupo mais predominantemente isolado foi *Streptococcus* spp., o que indica a alta prevalência desse gênero em casos de MSC. Tanto em amostras de PP quanto de MSC, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* apresentaram baixa frequência de isolamento apesar da alta frequência de SNA nas amostras com isolamento positivo. A baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* também foi relatada por Tomazi et al. (2014) em amostras de MSC, mas pode ser elencada como uma limitação do estudo, já que isso dificultou a avaliação do desempenho dos meios de cultura em identificar corretamente estes agentes.

Para a avaliação dos preditores de desempenho da identificação microbiológica dos meios de cultura cromogênicos, considerou-se a capacidade de identificação presuntiva de agentes causadores de mastite comparativamente à identificação por espectrometria de massa dos agentes isolados em ágar sangue. Neste sentido, nos casos em que a amostra apresentou isolamento em um ou ambos os meios cromogênicos, mas não apresentou crescimento em ágar sangue, considerou-se FP apesar da concordância entre o resultado presuntivo do meio cromogênico e a identificação por MALDI-TOF MS dos agentes isolados nos meios GP e/ou



S. Desta forma, isolados identificados corretamente pelos meios cromogênicos (concordância entre a identificação visual do meio cromogênico e a identificação por MALDI-TOF MS) foram considerados FP, em situações em que não houve isolamento em ágar sangue. No meio cromogênico GP (31 amostras; 29 de MSC e 2 de PP) e S (6 amostras de MSC) houve crescimento de agentes que tiveram concordância entre a identificação presuntiva e o resultado do MALDI-TOF MS, mas que não tiveram crescimento em ágar sangue. Essa distinção entre os resultados de isolamento dos meios de cultura pode estar associada à seletividade dos meios cromogênicos (PERRY, 2017), a qual diminui a competição entre microrganismos, permitindo desta forma, o crescimento de microrganismos não isolados em ágar sangue (que é um meio não seletivo).

No meio cromogênico GP observou-se elevada Se e Sp para os grupos *Streptococcus uberis*/*Enterococcus* spp e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*, tanto em amostras de MSC quanto em amostras de PP. Os valores de Se e Sp obtidos para amostras de MSC (Se = 89,1%; Sp = 96,3% para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e Se = 90,5%; Sp = 92,5% para *Streptococcus uberis*) são similares aos obtidos para a identificação de *Streptococcus* spp a partir da triplaca Minnesota Tri-plate (92,6% e 89,5%, respectivamente; MCCARRON et al., 2009a); e também, pelos resultados obtidos pelo meio cromogênico Accumast (Se: 90% e Sp: 93%, respectivamente; GANDA et al., 2016). Contudo, comparações diretas entre os estudos tornam-se limitadas, visto que os métodos utilizados no estudo de Ganda et al. (2016) e Maccarron et al. (2009a) não diferenciaram os grupos *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*, agrupando-os em *Streptococcus* spp. Esta capacidade de diferenciação observada no meio cromogênico GP possibilita às fazendas identificar mais especificamente o grupo e/ou patógeno e adotar medidas profiláticas específicas de controle de acordo com o tipo de *Streptococcus* isolado, visto que estes agentes apresentam patogenicidade e perfil de transmissão distintos entre si. As altas Se e SP em amostras de PP (Se = 100%; Sp = 99% para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e Se = 100%; Sp = 99,6% para *Streptococcus uberis*) indica que é possível obter resultado de identificação confiáveis para estes patógenos a partir de amostras PP.

Os valores de VPP foram de baixos a moderados para os grupos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp tanto em amostras de MSC (VPP = 70,7% e VPP = 63,3; respectivamente) quanto para as amostras de PP (VPP = 58,3 e VPP = 66,7; respectivamente). Estes resultados foram inferiores aos obtidos por Ganda et al. (2016) (Acumast) e Mccarron et al. (2009a) (Minnesota plate), mas foram próximos aos obtidos com o uso tanto da biplaca quanto da triplaca Minnesota Easy Culture System

(ROYSTER et al., 2014). Contudo, se fossem levados em conta os isolados do meio GP que não apresentaram crescimento em ágar sangue, os resultados seriam elevados, em especial nas amostras de MSC (VPP = 89,7% para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e VPP = 80% para *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp.) o que os igualaria aos resultados obtidos por Accumast e Minnesota plate.

O resultado de VPN dos grupos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. foi elevado tanto para amostras de MSC (VPN = 98,9% e VPN = 98,5%; respectivamente) quanto para amostras de PP (VPN = 100% para ambos os grupos de patógenos). Os resultados obtidos foram ligeiramente superiores aos da biplaca Minnesota Easy Culture System para *Streptococcus* spp, e similares aos obtidos pela triplaca Minnesota Easy Culture System (ROYSTER et al., 2014) e pelo método Accumast (GANDA et al., 2016). Os valores elevados de VPN indicam a assertividade do meio GP ao dar resultados negativos quando não há isolamento de agentes dos grupos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp.

Os valores de Se do meio cromogênico GP para identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus* foram inferiores em relação aos demais grupos de patógenos para amostras de MSC (Se = 25%) e PP (Se = 50%). Esta baixa Se pode ser atribuída a uma inconsistência no padrão de cores gerado para os diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos no experimento. Foram observadas diferentes tonalidades de rosa, não necessariamente condizentes à coloração característica associada à identificação de *Staphylococcus aureus* pelas recomendações do fabricante, o que gerou confundimento na identificação. Devido à grande quantidade de resultados FN, tanto em amostras de MSC (FN = 75%; 15/20) quanto em amostras de PP (FN = 50% 3/6), o VPP também foi comprometido (MSC = 38,5% e PP = 50%, respectivamente). Resultados semelhantes de Se e VPP foram obtidos para *Staphylococcus aureus* em amostras de MSC através do método de identificação microbiológica rápida kit VetoRapid (VIORA et al., 2014) e em MC pelas quadriplacas SSGN e SSGNC (FERREIRA et al., 2018). Contrariamente aos nossos resultados para amostras de MSC, no método 3M Petrifilm system (MCCARRON et al., 2009a) e, em MC nos métodos Accumast (GANDA et al., 2016) e Minnesota easy culture system II (ROYSTER et al., 2014), apresentaram resultados elevados de Se e VPP para a identificação de *Staphylococcus aureus*. No nosso estudo, utilizamos amostras de leite compostas de casos de MSC, e isso poderia resultar em menor contagem de unidades formadoras de colônias necessárias para isolamento de microrganismos em relação a amostras de MC. O fator de diluição das amostras de MSC pode ser uma das explicações da menor capacidade do meio

cromogênico GP em identificar *Staphylococcus aureus* a partir de amostras de MSC, visto que a baixa frequência de isolamento pode ter comprometido a avaliação do desempenho diagnóstico, o que pode ser observado pela amplitude dos intervalos de confiança.

Para o meio S, os resultados de Se e Sp de *Staphylococcus aureus* foram elevados em amostras de MSC (Se = 80%; Sp = 98,8%) e moderado a elevado para amostras PP (Se = 66,7%; Sp = 100%; respectivamente). O resultado de VPP foi intermediário para amostras MSC (VPP = 72,7) e o de VPN foi elevado (VPN = 99,2). No entanto, o VPP seria maior se fossem levadas em conta as amostras sem crescimento em ágar sangue (VPP = 90,9%). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Accumast (GANDA et al., 2016) e Minnesota easy culture system II (ROYSTER et al., 2014). A capacidade de identificação rápida de *Staphylococcus aureus* é fundamental para o controle da MSC no rebanho, visto que o patógeno apresenta grande capacidade de contágio, associa-se a casos de MSC crônicos de difícil tratamento e com taxas de cura inferiores a 25% (MISRA et al., 2018). Os resultados de identificação de *Staphylococcus aureus* pelo meio S podem auxiliar na tomada de decisão quanto à segregação e/ou descarte de vacas positivas para esse agente no rebanho. Adicionalmente, o meio S permite diferenciar outras duas espécies de *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*), o que não foi descrito no Minnesota easy culture system II e Accumast. Contudo, devido à baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*, não foi possível a determinação dos preditores para essas espécies.

Os resultados de Ac foram elevados para todos os grupos de patógenos, tanto em amostras de MSC quanto de PP, para ambos os meios de cultura cromogênicos avaliados. De forma semelhante ao obtido em nosso estudo, outros métodos de identificação microbiológica rápida como as quadriplacas SSGN e SSGNC (FERREIRA et al., 2018), 3M Petrifilm system (MCCARRON et al., 2009a), Minnesota easy culture system (ROYSTER et al., 2014); (FERREIRA et al., 2018) e Accumast (GANDA et al., 2016; FERREIRA et al., 2018) também apresentaram elevados valores de Ac. A elevada Ac demonstra a assertividade na identificação rápida dos patógenos/grupos de patógenos aos quais os meios cromogênicos GP e S se propõem a identificar.

A concordância entre o meio cromogênico GP e a metodologia padrão, representado pelo coeficiente  $K$ , foi substancial para os grupos de patógenos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* ( $K = 0,7604$ ) e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. ( $K = 0,7011$ ) para amostras de MSC. Em amostras de PP, para os mesmos grupos de patógenos, também se obteve concordância substancial ( $K = 0,7245$  para *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. e

$K = 0,6948$  para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*). A concordância observada no presente estudo foi superior à obtida para *Streptococcus* spp. pelas biplaca e triplaca Minnesota Easy Culture System (ROYSTER et al., 2014), porém foi ligeiramente inferior à obtida pelo Accumast (GANDA et al., 2016). No entanto, nenhum destes métodos permite a diferenciação dos *Streptococcus* por espécie, como descrito no meio cromogênico GP. A capacidade de diferenciar os grupos *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* pode auxiliar no controle da MSC, possibilitando, por exemplo, a segregação de vacas presuntivamente positivas para *Streptococcus agalactiae*, evitando o possível contágio. Além disso, as vacas cujas amostras tiveram isolamento do grupo *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* em meio GP, deverão ter novas amostras de leite coletadas para realização de identificação microbiológica laboratorial e diferenciação entre *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*. Nesse sentido, vacas confirmadamente infectadas por *Streptococcus agalactiae* poderão receber tratamento com antimicrobiano durante a lactação, já que altas taxas de cura são relatadas para este microrganismo (KEEFE, 2012).

Em amostras de MSC, o resultado de concordância obtido indica que o meio cromogênico GP foi um teste falho na identificação rápida de *Staphylococcus aureus* ( $K = 0,30295$ ), com resultados insatisfatórios da Se (25,0%) e VPP (38,5%). Para amostras de PP a concordância foi moderada ( $K = 0,4943$ ). Os resultados de concordância foram inferiores aos obtidos pelos métodos Accumast ( $K = 0,93$ ) (GANDA et al., 2016) e pelas biplaca e triplaca Minnesota Easy Culture System ( $K = 0,62$  e  $K = 49$ ; respectivamente) (ROYSTER et al., 2014), porém são similares aos obtidos por Griffioen et al. (2018) pela triplaca cromogênica CHROMagar Mastitis ( $K = 0,33$ ). O baixo coeficiente de concordância para identificação de *Staphylococcus aureus* indica uma limitação do meio GP, que pode estar novamente associado à inconsistência do padrão de cores produzido pelo meio para este patógeno, gerando uma grande quantidade de resultados FN.

O meio cromogênico S obteve concordância substancial na identificação rápida de *Staphylococcus aureus* tanto para amostras de MSC ( $K = 0,7266$ ) quanto para amostras de PP ( $K = 0,7982$ ). Nossos resultados foram ligeiramente inferiores à concordância quase perfeita obtida por Accumast (GANDA et al., 2016) em amostras de MC, o que pode estar associado à maior concentração de patógenos presentes nas amostras de MC em comparação às amostras de MSC. Porém, o coeficiente de concordância do meio S foi superior às concordâncias obtidas pela biplaca e triplaca Minnesota Easy Culture System (ROYSTER et al., 2014), triplacas cromogênicas CHROMagar Mastitis, Hardy Diagnostics Mastitis Triplate e

VétoRapid (GRIFFIOEN et al., 2018), indicando alta concordância entre o método de referência e a identificação presuntiva do meio S para *Staphylococcus aureus*. De forma similar ao observado com os demais preditores, a baixa frequência de isolamento dos patógenos *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis* não permitiu o cálculo do índice de concordância entre o meio cromogênico S e a metodologia padrão na identificação destes patógenos.

No caso das amostras que apresentaram isolamento de “outros microrganismos” no meio cromogênico GP, os resultados de Se foram baixos, tanto em MSC (Se = 49,1%) quanto em PP (Se = 32,9%). Resultados similares (baixos/intermediários) foram observados para o meio S em amostras de MSC (Se = 61,1) e PP (Se = 32,9). Em ambos os casos, a baixa Se está associada à grande quantidade de resultados FN nos meios de cultura cromogênicos. Esta grande quantidade de FN pode ser indicativo de que, em alguns casos, vacas com IIM causada por patógenos secundários poderiam ser subdiagnosticadas com o uso dos meios cromogênicos como único método de identificação. Contudo, é necessário salientar que os patógenos classificados como “outros microrganismos” não são o foco principal da identificação dos meios cromogênicos, visto que não há um padrão de cores associado a estes agentes nas recomendações do fabricante. Adicionalmente, os impactos associados às IIM causadas por patógenos secundários (e.g., SNA; *Corynebacterium* spp.) são menores do que os causados por patógenos principais (TOMAZI et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016).

Os resultados de Sp, VPP e VPN para o isolamento de “outros microrganismos” foram elevados/intermediários para ambos os meios cromogênicos, tanto em MSC quanto em PP, com única exceção do resultado baixo de VVP do meio S em amostras de MSC (VPP = 59,2). A elevada Sp observada nos meios GP e S, nas amostras de MSC e PP indica a assertividade no diagnóstico de amostras negativas para isolamento microbiológico, que é uma informação importante para a tomada de decisão no controle da mastite. Apesar disso, duas amostras de MSC apresentaram isolamento de *Streptococcus uberis* o qual deveria ter o crescimento inibido no meio cromogênico S, que é seletivo para *Staphylococcus* spp. Porém, nos dois casos, quando essas colônias foram reinoculadas em uma nova placa do meio cromogênico S, não houve isolamento microbiano, e o mesmo ocorreu após nova inoculação da amostra de leite. O crescimento de colônias de *Streptococcus uberis* no meio S pode estar associado à presença de resíduos de leite ou gordura aderidos ao ágar durante a inoculação. A presença destes resíduos pode ter fornecido o substrato para o desenvolvimento das colônias durante o período de incubação, visto que a transferência dos isolados de *Streptococcus uberis* para novas placas do meio S resultou em inibição do crescimento.

A Ac do grupo dos “outros microrganismos” foi elevada em ambos os meios de cultura e independente do tipo de amostra avaliada (MSC ou PP). A elevada Ac observada é um indicativo da capacidade do meio em isolar microrganismos nas amostras de leite de casos de IIM, mesmo que não seja possível a diferenciação da espécie ou grupo de microrganismos isolados. Além disso, a elevada Ac para os “outros microrganismos” indica, indiretamente, a capacidade seletiva dos meios GP e S, e a consistência dos padrões de cores obtidos para cada patógeno, o que minimiza a ocorrências de resultados FP.

É necessário salientar que o estudo apresenta limitações. A inspeção visual das colônias e a identificação presuntiva dos patógenos em meios cromogênicos foram realizadas por um único pesquisador em condições de laboratório (não na fazenda). No entanto, para minimizar o viés, o leitor ficou cego para os resultados da identificação no padrão ouro. Além disso, a limitação mais importante foi a baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus epidermididis* e *Staphylococcus saprophyticus* que limitou as inferências sobre o desempenho diagnóstico dos meios cromogênicos S sobre esses patógenos em específico. Apesar disso, para *Staphylococcus aureus*, que é o patógeno principal diagnosticado pelo meio S, a frequência de isolamento obtida foi suficiente para avaliação do desempenho diagnóstico.

De forma geral, independentemente do tipo de amostra (MSC ou PP), os meios de cultura cromogênicos GP e S apresentaram desempenhos satisfatórios para a identificação rápida dos patógenos aos quais se propunham a identificar. O meio cromogênico GP foi, de modo geral, eficiente na identificação dos patógenos/grupos de patógenos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis/Enterococcus spp.*, permitindo a diferenciação entre estes dois grupos sem a utilização de provas bioquímicas adicionais, o que não é possível em nenhum outro método usado em CMF. Contudo, o meio GP apresentou limitações na identificação de *Staphylococcus aureus*, com resultados inferiores a outros métodos de identificação rápida como 3M Petrifilm system (MCCARRON et al., 2009a) Accumast (GANDA et al., 2016), o que possivelmente está relacionado à inconsistência do padrão de cor associado à identificação do patógeno. Já o desempenho do meio cromogênico S foi, de modo geral, satisfatório para *Staphylococcus aureus*, principal patógeno (do ponto de vista da mastite bovina) ao qual o meio se propunha identificar. Os resultados obtidos para *Staphylococcus aureus* pelo meio S foram similares aos métodos Minnesota easy culture system II (ROYSTER et al., 2014) e Accumast (GANDA et al., 2016), o que indica seu potencial para uso em CMF para identificação específica deste patógeno.

Em síntese, os meios cromogênicos testados apresentaram desempenho similar a outros métodos de identificação microbiológica rápida utilizados em CMF, com a vantagem

de possibilitar diferenciação em nível de espécie para os grupos *Streptococcus* (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* no meio GP) e *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* no meio S). O meio cromogênico GP apresentou desempenho satisfatório para identificação rápida dos grupos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp., apesar das limitações na identificação de *Staphylococcus aureus*, expressas pelos baixos valores de Se e VPP. Compensatoriamente, o meio S teve desempenho diagnóstico satisfatório na identificação de *Staphylococcus aureus*, o que indica que este meio pode ser uma alternativa para diagnóstico rápido deste agente a partir de amostras de MSC e PP.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados de desempenho diagnóstico dos meios cromogênicos GP e S foram, de forma geral, satisfatórios para a identificação dos principais patógenos associados à mastite em amostras de PP e MSC durante a lactação, com a exceção da identificação de *Staphylococcus aureus* no meio GP. Tanto nas amostras de MSC quanto nas amostras de PP, resultados satisfatórios de Se, Sp, VPP, VPN e K foram obtidos na identificação dos grupos *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* no meio GP e para *Staphylococcus aureus* no meio S. Adicionalmente, a possibilidade de identificação microbiológica rápida (de 18 a 24h) e a capacidade de discernimento entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. sugerem que os meios GP e S são alternativas viáveis para identificação rápida de agentes causadores de MSC e para monitoramento de vacas em PP.

## REFERÊNCIAS

- ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis Bovine Mastitis Intramammary infection Diagnosis. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 479–491, 2018
- AJITKUMAR, P.; BARKEMA, H. W.; BUCK, J. D. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 332–340, 2012.
- AKINEDEN, Ö. **et al.** A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Research**, v.78, p. 38–42, 2010.
- AMARAL, B. C. **et al.** Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 86–96, 2011.
- ARRUDA, A. G. **et al.** Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. Quarter-level outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4419–4435, 2013.
- BANNERMAN, T. L. **et al.** Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification Card for Species Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1322–1325, 1993.
- BARCELOS, M. M. **et al.** Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019.
- BARKEMA, H. W. **et al.** Management Practices Associated with the Incidence Rate of Clinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1643–1654, 1999.
- 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, n. 12, p. 5661–5667, 2010.



BARREIRO, J. R. **et al.** Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2928–2934, 2017.

BECKER, K. **et al.** Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of Staphylococcus Species Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of Staphylococcus Species. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988 -4995, 2004.

BOGNI, C. **et al.** War against mastitis : Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. p. 483–494, 2011.

BORNE, B. H. P. **et al.** Intramammary antimicrobial treatment of subclinical mastitis and cow performance later in lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 4441–4451, 2019.

BORNE, B. H. P. **et al.** Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 4, p. 265–273, 2011.

BRAGA, P. A. C. **et al.** Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 994–1008, 2013.

BUSANELLO, M. **et al.** Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545–6553, 2017.

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**, n. 1, p. 1–10, 2015.

CANTEKİN, Z. **et al.** Comparison of PCR and Culture Methods for Diagnosis of Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 21, n. 2, p. 277–282, 2015.

CERVINKOVA, D. **et al**, Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 11, p. 567–575, 2013.

CHANDRASHEKHAR, K. M.; ISLOOR, S. Limit of detection of genomic DNA by conventional PCR for estimating the load of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Folia Microbiol**, 2015.

CAROLIS, E. **et al**, Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Journal of Infection in Developing Countries**. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 9, p. 1081 - 1088, 2014.

DE VliegHER, S.; OHNSTAD, I.; PIEPERS, S. Management and prevention of mastitis: A multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 1214 – 1233, 2018.

DIESER, S. **et al**, Prevalence of Pathogens Causing Subclinical Mastitis in Argentinean Dairy Herds. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 124 - 126, 2014.

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.

DÜRR, J. W. **et al**, Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. **Livestock Science**, v. 117, p. 225–232, 2008.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Vet Clin Food Anim**, v. 19, p. 109–138, 2003.

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**, v. 13, n. 3, p. 1–15, 2018.

FOGSGAARD, K. K.; BENNEDSGAARD, T. W.; HERSKIN, M. S. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1730–1738, 2015.

FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 475–487, 1993.

FREU, G. **et al**, Internal Teat Sealant Administered at Drying off Reduces Intramammary Infections during the Dry and Early Lactation Periods of Dairy Cows. **Animals**, v. 1522, n. 10, p. 1–16, 2020.

GANDA, E. K. **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**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

GOMES, F.; FERREIRA, I. C. F. R.; HENRIQUES, M. Heliyon Anti-bio film activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Heliyon**, v. 5, 2019.

GONÇALVES, J.L. **et al**, Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. **The Veterinary Journal**, v. 209, p. 87–92, 2016.

GONÇALVES, J. L. **et al**, Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, p. 1–10, 2018b.

GONÇALVES, J. L. **et al**, Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, n. 210, p. 25–32, 2018a.

GONÇALVES, J. L. **et al**, Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, 2020.

GRABER, H. U. **et al**, Bovine *Staphylococcus aureus*: Diagnostic properties of specific media. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 38–44, 2013.

GRANJA, B. M. Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina. 2020. 75p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

- GRIFFIOEN K **et al**, Agreement between four commercial diagnostic tests and routine bacteriological culture of milk to determine the udder infection status of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 157, n. December 2017, p. 162–173, 2018.
- HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103–2112, 1994.
- HOGAN, J. H.; SMITH, K. L. S. Review article Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 507–519, 2003.
- HOGVEEN, H. **et al**, Economic aspects of mastitis : New developments Economic aspects of mastitis : New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16 -23, 2011.
- HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M.; HOGVEEN, H. Costs of mastitis : facts and perception. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 113 - 120, 2008.
- HUSZENICZA, G. **et al**, Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 83, p. 389–400, 2004.
- KEEFE, G. Update on Control of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae for Management of Mastitis. **VFP**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.
- KRÖMKER, V. **et al**, Risk factors for intramammary infections and subclinical mastitis in post-partum dairy heifers. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 304–309, 2012.
- Lago, A. Efficacy of On-Farm Programs for the Diagnosis and Selective Treatment of Clinical and Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. 2009. 281p. Tese (Doutorado) - University of Minnesota, St. Paul.
- LAGO, A.; GODDEN, S. M. Use of Rapid Culture Systems to Guide Clinical Mastitis Treatment Decisions. **Vet Clin Food Anim**, v. 34, p. 389–412, 2018.

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, n. 9, p. 4441–4456, 2011a.

LAGO, A. **et al**, The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4457–4467, 2011b.

LANGE, C. C. **et al**, Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36–40, 2011.

LANGE, C. C. **et al**, Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 176, p. 382–388, 2015.

LEELAHAPONGSATHON, K.; SCHUKKEN, Y. H. Quarter , cow , and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. **Trop Anim Health Prod**, 2014.

LEELAHAPONGSATHON, K. **et al**, Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 1–9, 2016.

LUNDBERG, Å. **et al**, Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 1–16, 2016.

MCCARRON, J. L. **et al**, Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2297–2305, 2009a.

MCCARRON, 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 mastitic milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5326–5333, 2009b.

MISRA, N. **et al**, Immunoproteomics to identify *Staphylococcus aureus* antigens expressed in bovine milk during mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 1–14, 2018.

MOREIRA, L. H. **et al**, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, n. December 2017, p. 246–251, 2018.

MORRISON, E. I.; DEVRIES, T. J.; LEBLANC, S. J. Short communication: Associations of udder edema with health , milk yield , and reproduction in dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9521–9526, 2018.

NAQVI, S. A.; BUCK, J. De; DUFOUR, S.; BARKEMA, H. W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 1–15, 2018.

NATZKE, R. P. Therapy : One Component in a Mastitis Control System. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 12, p. 1895–1901, 1971

NONNEMANN, B. **et. al**, Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 1–10, 2019.

OBAIDAT, M. M.; BANI SALMAN, A. E.; ROESS, A. A. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA* *Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 2, p. 405–412, 2018.

OLIVER, S. P. **et al**, Extended Ceftiofur Therapy for Treatment of Experimentally-Induced *Streptococcus uberis* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3322–3329, 2004.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. **VFP**, v. 28, n. 2, p. 165–185, 2012.

PARKER, K. I. **et al**, Quarter-Level Analysis of Subclinical and Clinical Mastitis in Primiparous Heifers Following the Use of a Teat Sealant or an Injectable Antibiotic, or Both, Precalving. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 169–181, 2008.

PERRY, J. D. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 449–479, 2017.

PIÑEIRO, J. M. **et al**, Associations of pre- and postpartum lying time with metabolic, inflammation, and health status of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1–14, 2019.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262–273, 2007.

PUMIPUNTU, N. **et al**, Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. **Veterinary World**, v. 10, n. 7, p. 721–726, 2017.

PYÖRÄLÄ, S. Review article Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 565–578, 2003.

RATO, M. G. **et al**, Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine *Streptococcus uberis*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4542–4551, 2009.

REES, A.; HEUWIESER, W. Udder firmness as a possible indicator for clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1–14, 2017.

REIST, M. **et al**, Estimation of Energy Balance at the Individual and Herd Level Using Blood and Milk Traits in High-Yielding Dairy Cows 1 , 2. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3314–3327, 2002.

REKSEN, O. **et al**, Relationships Between Milk Culture Results and Treatment for Clinical Mastitis or Culling in Norwegian Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2928–2937, 2006.

REYES, J. **et al**, Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy**

**Science**, v. 98, n. 8, p. 5294–5303, 2015.

REYHER, K. K.; DOHOO, I. R. Diagnosing intramammary infections : Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3387–3396, 2011.

ROSSI, R. S. **et al**, Diagnostic accuracy of Somaticcell , California Mastitis Test , and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 10220-10229, 2018.

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 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.

RUEGG, P.; GODDEN, S.; LAGO, A.; BEY, R.; LESLIE, K. On-Farm Culturing for Better Milk Quality. **Western Dairy Management Conference**, p. 149 - 159, 2005.

RUEGG, P. L. New Perspectives in Udder Health Management. **Vet Clin Food Anim**, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2012.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

RUEGG, P. L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. **Vet Clin Food Anim**, v. 34, n. 3, p. 413–425, 2018.

SAMSON, O. **et al**, Use of on-farm data to guide treatment and control mastitis caused by *Streptococcus uberis*. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7690–7699, 2016.

SEEGERS, H. **et al**, Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v. 34, p. 475–491, 2003.



SURIYASATHAPORN, W. **et al**, b-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 177–186, 1999.

SURIYASATHAPORN, W. **et al**, Hyperketonemia and the impairment of udder defense : a review. **Veterinary Research**, v. 31, n. 4, p. 397-412, 2000.

SYRING, C. **et al**, Bovine mastitis: The diagnostic properties of a PCR-based assay to monitor the *Staphylococcus aureus* genotype B status of a herd, using bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3674–3682, 2012.

TAUCH, A.; FERNA, I.; SORIANO, F. International Journal of Infectious Diseases A microbiological and clinical review on *Corynebacterium kroppenstedtii*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 33–39, 2016.

TENHAGEN, B. **et al**, Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, p. 2542–2551, 2006.

THORBERG, B.; EMANUELSON, U.; WALLER, K. P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962–4970, 2009.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental Streptococcal Intramammary Infections of the Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2366–2374, 1995.

TOMAZI, T. **et al**, Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3071–3078, 2015.

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**, v. 52, n. 5, p. 1658 –1663, 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.

VIORA, L. **et al**, Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis. **Veterinary Record**, v. 175, n. 4, p. 89, 2014.

WAAGE, S. **et al**, Case-Control Study of Risk Factors for Clinical Mastitis in Postpartum Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 392–399, 2001.

WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; BARRINGTON, G. M. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 2, p. 259–262, 2006.

WHIST, A. C.; ØSTERAS, S.; SØLVERØD, L. Streptococcus dysgalactiae Isolates at Calving and Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 766–778, 2007.

WILSON, D. J.; ADKINS, P. Test Agreement among Biochemical Methods, MALDI-TOF and 16S rRNA Sequencing for the Identification of Microorganisms Isolated from Bovine Milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 1 - 22, 2018.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine Mastitis Pathogens in New York and Pennsylvania : Prevalence and Effects on Somatic Cell Count and Milk Production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592–2598, 1997.

WIRTH, H. **et al**, MALDI-typing of infectious algae of the genus Prototheca using SOM portraits. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 1, p. 83–97, 2012.

ZADOKS, R. N. **et al**, Sources of Klebsiella and Raoultella species on dairy farms: Be careful where you walk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 1045–1051, 2011.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 357–372, 2011.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. **Vet Clin Food Anim**, v. 22, p. 229–261, 2006.