

USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS NO TRATAMENTO DE MASTITE E APLICABILIDADE DE SISTEMAS DE CULTURA BACTERIANA NA FAZENDA

Breno Luis Nery Garcia¹, Brunna de Mattos Granja¹, Carlos Eduardo Fidelis¹,

Gustavo Freu¹, Marcos Veiga dos Santos¹.

¹Laboratório Qualileite, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (VNP-FMVZ/USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil

RESUMO

Os sistemas de cultura na fazenda (SCF) foram desenvolvidos como alternativa para a identificação presuntiva rápida dos principais agentes causadores de mastite na própria fazenda. Meios de cultura cromogênicos podem ser alternativas para identificar agentes causadores de mastite em vacas leiteiras, com praticidade e rapidez. Assim, esta revisão abordará três estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico de meios cromogênicos na identificação rápida de agentes causadores de mastite clínica (MC) e subclínica (MSC) em vacas em lactação e pós-parto (PP). A identificação dos agentes por meios cromogênicos baseou-se na análise da coloração das colônias microbianas, e a identificação por MALDI-TOF MS foi considerada metodologia padrão. No estudo 1, foram avaliados dois meios cromogênicos seletivos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GP e GN, respectivamente; CHROMagar™, França). Para isso, utilizou-se 476 amostras de MC e 660 de MSC. No estudo 2; 476 amostras de MC e 500 de MSC foram avaliadas por triplaca contendo meios cromogênicos seletivos *Streptococcus* (Strep.), *Staphylococcus* (Staph.) e GN (Smartcolor2, Onfarm™, Piracicaba, Brasil). No estudo 3, foram avaliadas 504 amostras de MSC e 536 amostras de leite PP. As amostras foram inoculadas nos meios cromogênicos GP e Staph. Os resultados de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) no estudo 1 foram de 100% e 94% para *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp., Sp de 100% para *Pseudomonas* spp. e 99% para *Staphylococcus aureus*. No estudo 2, observou-se Se de 100%, *Prototheca/Levedura*, 100% *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*, e Sp de 100%

para *Serratia*. No estudo 3, observou-se Se de 80% e Sp de 89,8% para *Staphylococcus aureus* em Staph. e Se de 92,3% e Sp 90,5% para *Streptococcus uberis/Enterococcus* em GP. Os resultados obtidos sugerem que meios de cultura cromogênicos podem ser alternativas para uso em programas de cultura na fazenda.

Palavras-chave: Cultura na fazenda. Mastite. Identificação rápida.

INTRODUÇÃO

Mastite bovina é uma das doenças mais prevalentes em rebanhos leiteiros. Os impactos ocasionados pela mastite podem afetar tanto a produtividade quanto a rentabilidade dos rebanhos (RUEGG, 2017). Os principais custos diretos relacionados à mastite associam-se à diminuição da qualidade do leite, custos com tratamentos, descarte de leite com resíduo de antimicrobianos e aumento do risco de morte de vacas nos casos de mastite clínica (MC) grave (DOWN *et al.*; 2017). Adicionalmente, casos de mastite subclínica (MSC) podem levar a perdas de produção entre 0.07 a 1.4 kg em quartos mamários afetados, variando de acordo com o tipo de agente causador (GONÇALVES *et al.*, 2018), o que implica em custos indiretos na produção leiteira.

A mastite também é a principal causa do uso de antimicrobianos nos rebanhos leiteiros, em especial para o tratamento de casos de MC. Estima-se que o tratamento da mastite responda por 80% do uso de antimicrobianos nas fazendas (VIORA *et al.*, 2014; POL; RUEGG, 2007). Contudo, o uso de antimicrobianos nem sempre se justifica, visto que 44% das amostras de leite de casos de MC não tem crescimento em cultivo microbiológico convencional e ou-

tros 27% tem isolamento de agentes Gram-negativos, que apresentam elevada chance de cura espontânea apesar de pouco responsivos à maior parte dos antimicrobianos (TOMAZI et al., 2018). Desta forma, a identificação dos agentes causadores de mastite é fundamental para a definição de protocolos de tratamento eficazes e pode servir como direcionador para uso racional dos antimicrobianos.

Para a identificação microbiológica dos agentes causadores de mastite, preconiza-se a cultura microbiológica de amostras de leite em laboratórios especializados. Entretanto, atualmente a identificação microbiológica laboratorial ainda é pouco difundida entre as fazendas leiteiras (MCCARRON et al., 2009b), o que implica na adoção de protocolos de tratamento sem o diagnóstico do agente causador. Dentre as limitações do uso da cultura microbiológica laboratorial destacam-se a dificuldade logística de envio de amostras e o longo intervalo de tempo entre o envio de amostras e a obtenção dos resultados de cultura (LAGO et al., 2011a).

Visando facilitar a logística associada à identificação microbiológica, os sistemas de cultura na fazenda (SCF) foram desenvolvidos como alternativa para a identificação presuntiva rápida dos principais agentes causadores de mastite na própria fazenda. O sistema consiste no uso de meios de cultura seletivos para a diferenciação dos microrganismos, e possibilita a identificação dos agentes causadores de mastite em até 24 horas (ROYSTER et al., 2014). A identificação rápida dos agentes causadores de mastite auxilia na definição de medidas preventivas ou de controle da mastite e possibilita a redução em até 50% do uso de antimicrobianos no controle da mastite (LAGO et al., 2011).

Dentre os diferentes métodos de identificação utilizados em SCF, os meios de cultura cromogênicos destacam-se por possibilitar a diferenciação visual de grupo ou espécie bacteriana, sem a necessidade de realização de testes bioquímicos (PERRY, 2017). A identificação microbiológica é realizada de forma direta pela coloração das colônias isoladas no meio. Enzimas específicas associadas ao metabolismo de cada grupo ou espécie de microrganismos reagem com substratos presentes no meio de cultura, formando cromóforos que, por sua

vez, alteram a coloração das colônias bacterianas, possibilitando a diferenciação entre as espécies de interesse (GANDA et al., 2016). Comparado com outros métodos utilizados em SCF (e.g., Triplacas Minnesota Easy System e/ou Quadriplacas Mastitis SSGN), os meios de cultura cromogênicos apresentam desempenho diagnóstico superior em relação à especificidade (Sp), sensibilidade (Se) e acurácia (FERREIRA et al., 2018). Além disso, meios cromogênicos são eficientes em identificar contaminação em amostras de leite (GRIFFIOEN et al., 2018), o que pode reduzir problemas de identificação de agentes patogênicos.

Estudos prévios sobre o desempenho de meios de cultura cromogênicos foram desenvolvidos nos EUA (GANDA et al., 2016), com resultados de 82,3% de Se e 89,9% de Sp para os meios cromogênicos testados (GANDA et al., 2016). Na Europa, Griffioen et al. (2018) constataram maior capacidade de identificação de contaminação nas amostras através dos meios cromogênicos testados, o que minimiza confundimento no diagnóstico. No Brasil em estudo realizado por Granja (2020), os meios cromogênicos apresentaram Se de 90% Sp de 99% no diagnóstico de *Staphylococcus aureus*.

Em razão da praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, os meios cromogênicos são alternativas para SCF. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre o uso de meios cromogênicos na identificação microbiológica de amostras de MC, MSC e de leite de vacas em pós-parto (PP).

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA CROMOGÊNICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

Três estudos de nosso grupo de pesquisa foram realizados com objetivo avaliar o desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos na identificação microbiológica de amostras de MC, MSC e PP. A hipótese estudada foi de que meios de cultura cromogênicos apresentam equivalente acurácia, Se, Sp, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e coeficiente de concordância *kappade* Cohen(k) para identificação rápida dos principais agentes causadores de mastite.

Quatro meios de cultura cromogênicos foram testados nos três estudos: Mastitis GP (GP); Mastitis GN (GN); *Staphylococcus* (Staph) e *Streptococcus* (Strep) (CHROMagar, Paris, França). O meio de cultura GP é seletivo para o crescimento de bactérias Gram-positivas, e foi interpretado 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*.

O meio de cultura cromogênico GN é seletivo para crescimento de microrganismos Gram-negativos, Levedurae *Prototheca* spp., e foi avaliado com base nas seguintes colorações das colônias: a) roxa – *Escherichia coli*; b) azul metálica – *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp./*Serratia* spp.; c) amarela/creme/translúcida – *Pseudomonas* spp.; d) branca e seca – Levedura/*Prototheca* spp (Figura 1).

O meio cromogênico Staph é seletivo para *Staphylococcus* spp., e apresenta o seguinte padrão de cores de colônia: a) rosa – *Staphylococcus aureus*; b) colônia incolor/rosada – *Staphylococcus epidermidis*; c) azul turquesa – *Staphylococcus saprophyticus*.

O meio de cultura cromogênico Strep é seletivo para *Streptococcus* spp., e foi avaliado com base nas seguintes colorações das colônias: a) azul escuro – *Streptococcus uberis*; b) azul turquesa – *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus dysgalactiae*; c) roxo – *Enterococcus* spp.; d) roxo claro (lilás) – *Lactococcus* spp.

No estudo 1, placas bipartidas contendo os meios GP e GN foram utilizadas para identificação dos patógenos causadores de mastite. Para o estudo 2, triplacas com os meios GN, Staph e Strep (Smartcolor2, Onfarm, Piracicaba, Brasil) foram avaliadas. Já no estudo 3 os meios cromogênicos GP e Staph foram testados separadamente e, portanto, foram utilizadas placas separadas de cada um dos meios.

Para os estudos 1 e 2, foram selecionadas aleatoriamente amostras de leite de vacas com MC e MSC, enviadas para a rotina de identificação microbiológica do Laboratório de Pesqui-

sa em Qualidade do Leite (Qualileite - FMVZ/USP). As amostras de leite coletadas nas fazendas foram enviadas ao laboratório em caixas isotérmicas e mantidas refrigeradas a -20°C por no máximo 30 dias até a inoculação. Os critérios para identificação dos casos de MC e MSC foram adotados pelas próprias fazendas de forma independente. Considerou-se MC quando foram observadas alterações nas características do leite (e.g. presença de grumos, coágulos, sangue, pus) e/ou sinais clínicos na glândula mamária (e.g. inchaço, vermelhidão, dor no úbere). Para os casos de MSC, o critério adotado foi a contagem de células somáticas (CCS) do leite >200.000 células/mL, dado que na MSC não há alterações visuais nas características do leite (ADKINS; MIDDLETON, 2018).

No estudo 3, foram utilizadas amostras de leite de vacas com MSC e vacas em PP provenientes de 6 rebanhos leiteiros que concordaram em participar do estudo. Para a seleção das vacas com MSC, foram realizadas coletas compostas de leite (*pool* de quartos mamários) para análise de CCS de todas as vacas em lactação durante dois meses. Vacas que apresentaram CCS >200.000 células/mL tiveram amostras compostas de leite coletadas pelos membros da equipe do estudo e submetidas a identificação microbiológica. Para as amostras de PP, foram selecionadas vacas em início de lactação com 7 ± 3 dias PP. Os procedimentos de coleta foram realizados por funcionários das fazendas previamente treinados. Nos dois tipos de amostra, foram excluídas do estudo vacas que apresentaram MC, doenças que não mastite, ou que foram submetidas à antibioticoterapia em período inferior a 14 dias antes da coleta de amostras para o estudo.

Nos três estudos, amostras de leite coletadas para identificação microbiológica foram aliquotadas (0,01 mL) e inoculadas simultaneamente em: a) ágar sangue suplementado com 5% de sangue bovino; e b) meios cromogênicos testados. Após inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e posteriormente foram avaliadas visualmente quanto ao isolamento microbiano. No ágar sangue avaliou-se na leitura os seguintes aspectos: a) número de colônias; b) coloração; c) tamanho; e d) presença de hemólise. Nos meios

cromogênicos testados, a identificação presumtiva foi realizada a partir da análise visual do padrão de cores associado ao isolamento microbiano (Figura 1). A leitura visual das placas foi realizada segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram consideradas contaminadas quando apresentaram >3 tipos diferentes de microrganismos (PARKER et al., 2008), enquanto amostras com isolamento de 2 microrganismos diferentes foram consideradas “cultura mista”.

Após a leitura visual das placas, os isolados foram submetidos à identificação microbiológica por MALDI-TOF MS conforme descrito por Barcelos et al (2019). A identificação microbiológica por MALDI-TOF MS foi realizada para todos os isolados, tanto os que apresentaram crescimento positivo em ágar sangue, quanto os isolados com crescimento nos meios cromogênicos testados.

Os indicadores de desempenho diagnóstico da identificação microbiológica dos meios cromogênico foram calculados em comparação à identificação microbiológica por MALDI-TOF MS que foi adotada como padrão ouro. Amostras que apresentaram contaminação em um dos dois resultados (AS ou meios de cultura cromogênicos) foram excluídas na análise final dos resultados.

Foram calculados a Ac, Se, Sp, VPP e VPN a partir dos resultados de: Verdadeiro Positivo (VP); quando houve concordância do mesmo microrganismo identificado no meio de cultura cromogênico e na metodologia padrão, Verdadeiro Negativo (VN); quando não houve isolamento nos meios de cultura cromogênicos e na metodologia padrão, Falso Positivo (FP); quando houve crescimento de algum microrganismo na metodologia padrão diferente do diagnosticado nos meios cromogênicos e Falso Negativo (FN); quando não houve crescimento de microrganismo nos meios cromogênicos mas houve crescimento na metodologia padrão (FERREIRA et al., 2018). Os resultados de desempenho diagnóstico analisados (Ac, Se, Sp, VPP e VPN) foram classificados como baixos (<60%), intermediários (>60%) e altos (>80%) (ROYSTER et al., 2014).

O coeficiente *k* foi calculado utilizando o

PROC FREQ do SAS (2009). Valor de *k* igual a 1 foi considerado 100% de concordância; valores entre 0,81 e 1 foram considerados concordância quase perfeita; de 0,61 a 0,8 coeficiente substancial; de 0,41 a 0,6 indicam moderada concordância e valores entre 0,21 a 0,4 considerou-se teste falho (FERREIRA et al., 2018).

Avaliação de biplaca de meios cromogênicos para identificação de agentes causadores de mastite

No presente estudo, foi avaliado o desempenho diagnóstico de uma biplaca contendo meios de cultura cromogênicos GP e GN para a rápida identificação dos principais microrganismos causadores de MS e MSC em amostras de leite. Na identificação dos principais patógenos em amostras de MC, identificou-se valores de Se entre 56-100%. Já para MSC, foram observados valores de Se de 89-94%. Quando analisada a Sp foram encontrados valores entre 95-99% para MSC e 96-99% para MC. O uso da biplaca para identificação de *Streptococcus uberis* possibilitou a obtenção de alta Se (>94%) e Sp (>95%) tanto nas amostras de

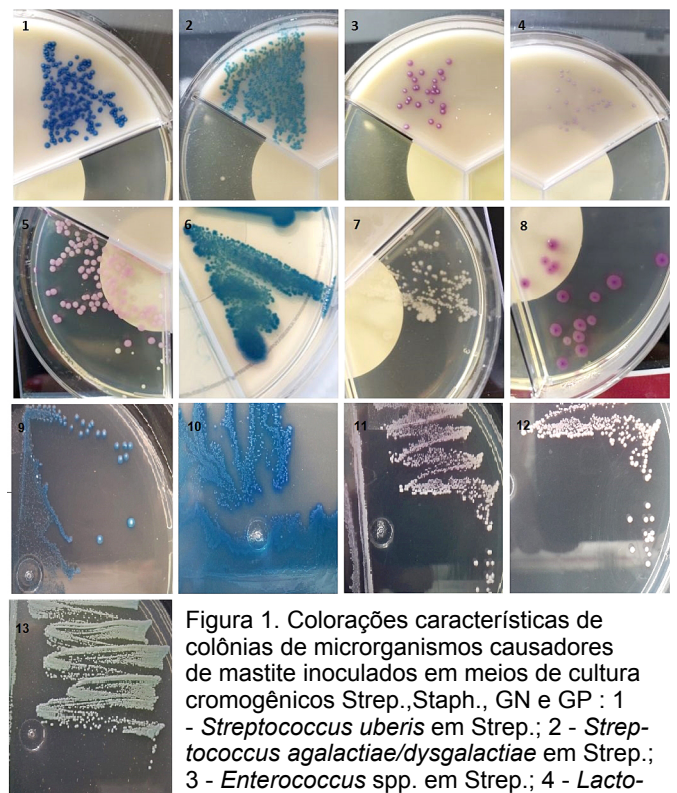


Figura 1. Colorações características de colônias de microrganismos causadores de mastite inoculados em meios de cultura cromogênicos Strep., Staph., GN e GP: 1 - *Streptococcus uberis* em Strep.; 2 - *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* em Strep.; 3 - *Enterococcus* spp. em Strep.; 4 - *Lactococcus* spp. em Strep.; 5 - *Staphylococcus aureus* em Staph.; 6 - *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp. em GN; 7 - *Prototheca* spp./*Levedura* em GN; 8 - *Escherichia coli* em GN; 9 - *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* em GP; 10 - *Streptococcus uberis* em GP; 11 - *Staphylococcus aureus* em GP; 12 - *Staphylococcus epidermidis* em Staph.; 13 - *Staphylococcus saprophyticus* em Staph. Adaptado de Granja (2020).

MC quanto de MSC. Para a Se, a identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* variou de 72% (MC) a 89% (MSC), enquanto a Sp foi >96% em amostras de MC e MSC. Resultados similares foram descritos para identificação de bactérias do grupo *Streptococcus* spp., com o uso de triplaca contendo meio de cultura enriquecido com cristal de sulfato de tálio modificado (MKTK), o qual apresentou Se de 92,6% e Sp de 89,5% (MCCARRON *et al.*, 2009). A diferenciação da coloração entre colônias de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* não é possível no diagnóstico pela biplaca o que é uma limitação para a utilização do meio GP. Pelo fato de ambas as espécies apresentarem coloração similar (azul claro/turquesa), necessita-se o uso de testes complementares, como a avaliação de hidrólise de hipurato ou o teste de CAMP/Esculina para a completa diferenciação entre as espécies, (NMC 2017).

Na avaliação do meio cromogênico GP observou-se baixa Se (56%) e VPP (69%) para identificação de *Staphylococcus aureus* em amostras de MC, o qual teve baixa prevalência nas amostras de leite avaliadas (9/476). Um estudo que avaliou o kit VetoRapid (VetoRapid, Vétoquinol, Buckinghamshire, UK) obteve resultados similares, o qual apresentou Se de 57% e VPP de 54% para amostras de MSC (VIORA *et al.*, 2014). Diferentemente do observado na avaliação das amostras de MC, para amostras de MSC, o meio de cultura GP apresentou elevado valor de Se (92%) na identificação de *Staphylococcus aureus*. Estudos utilizando meios de cultura cromogênicos seletivos para *Staphylococcus* spp. relataram Se de 100% e Sp de 99,8% para identificação de *Staphylococcus aureus* (GANDA *et al.*, 2016).

Em relação às bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de MC, o meio de cultura cromogênico GN apresentou Se de 89% e Sp 97% para identificação de *Escherichia coli*. Ainda em relação a esta espécie, foram observados valores de Se de 67% e Sp de 98% nas amostras de MSC. Resultados similares foram descritos para de identificação de *Escherichia coli* utilizando triplaca Accumast, com Se = 100% e Sp = 96,5%, e para *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp./*Serratia* spp. (KES) com Se = 98% e Sp = 96% (FERREIRA *et al.*, 2018).

Por outro lado, foram observados resultados inferiores de Se (75%) para identificação de *Escherichia coli* em meio de cultura cromogênico GN (Gandaet *al.* 2016). Em nosso estudo, para as amostras de MC, a identificação de *Prototheca/Levedura* apresentou Se de 73% e Sp de 100%, o que indica que este meio de cultura pode ser uma ferramenta para a rápida identificação presuntiva destes patógenos, no entanto, são necessários testes adicionais para a completa diferenciação entre este grupo de microrganismos.

Os resultados de VPP da biplaca contendo cromogênicos variaram de 60-69% nas amostras de MC e 36-87% para as amostras de MSC, enquanto os resultados de VPN foram ≥97% nas amostras de MC e MSC. O VPP variou em relação a espécie de microrganismo, sendo menor para identificação de *Staphylococcus aureus* (64%) e *Streptococcus uberis* (60%) em amostras de MC, enquanto, em amostras de MSC, os menores valores de VPP foram obtidos na identificação de *Streptococcus uberis* (36%), e *Escherichia coli* de (31%). Os resultados de VPP obtidos no presente estudo foram menores quando comparados aos descritos com o uso do kit VetoRapid, cujo valor de VPP para identificação de *Streptococcus uberis* foi 48%, para *Staphylococcus aureus* 52% e para *Escherichia coli* 72% (VIORA *et al.*, 2014). Da mesma forma, estudos observaram resultados semelhantes ao de Vioraet *al* (2014), com valores de VPP de 79% para *Escherichia coli* (GANDA *et al.*, 2016), e 49,3% para *Staphylococcus aureus* (MCCARRON *et al.*, 2009). Ainda em relação a identificação de *Escherichia coli*, o uso de meio de cultura Accumast apresentou valores de VPP de 76,5%, ao passo que o uso de meio SSGNC resultou em valores de VPP de 55%. (FERREIRA *et al.*, 2018). As diferenças de resultados de VPP quando comparados a outros estudos estão associadas com a prevalência dos agentes nas amostras testadas. Os resultados de VPN foram ≥97% tanto em amostras de MC quanto de MSC, o que sugere elevada capacidade da biplaca de meios cromogênicos identificar corretamente amostras com resultados negativos.

A concordância de resultados de identificação entre a metodologia padrão e o meio

GP em casos de MC foi moderada para *Staphylococcus aureus* ($k = 0.47$) e substancial para *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* ($k = 0.67$). Por outro lado, a concordância de resultados foi falha para *Streptococcus uberis* ($k = 0.35$) e concordância quase perfeita para *Staphylococcus aureus* ($k = 0.88$) nas amostras de MSC. Recentemente um estudo no qual foram utilizados quatro métodos de diagnóstico rápido na fazenda (CHROMagar Mastitis, Hardy-Diagnostics Mastitis Triplate, Minnesota Easy-Culture S-II Tri-plate e VétoRapid), demonstrou concordância falha entre a cultura microbiológica padrão e os meios de cultura cromogênicos CHROMagar, principalmente para as bactérias Gram-positivas ($k = 0.23$; $>0.20-0.40$) (GRIFFOEN *et al.*, 2018). Os valores de *Kappa* ($k = 0.88$) obtidos no meio GP para identificação de *Staphylococcus aureus* em amostras de MSC foram similares aos descritos no meio Accumast (GANDA *et al.*, 2016), que apresentou concordância quase perfeita de $k = 0.93$ com a metodologia padrão.

Para a identificação de bactérias Gram-negativas em amostras de MC, os resultados de concordância do meio GN e da metodologia padrão foi de $k \geq 0.8$ para *Escherichia coli* ($k = 0.84$), indicando concordância quase perfeita entre as metodologias avaliadas. Este elevado valor de concordância foi similar aos resultados descritos com o meio de cultura Accumast, com concordância de $k = 0.81$ para bactérias Gram-negativas (FERREIRA *et al.*, 2018). Já para *Levedura/Prototheca* o valor *Kappa* foi de 0,8, indicando elevada concordância entre omeiocromogênio e identificação pela metodologia padrão.

Avaliação de triplaca de meios cromogênicos para identificação de agentes causadores de mastite

No presente estudo, foi avaliado o desempenho diagnóstico de triplaca contando meios de cultura cromogênicos (SmartColor2, On-Farm, Piracicaba, Brasil), para a rápida identificação dos principais microrganismos causadores de mastite em amostras de leite. Os resultados de Se obtidos pela triplaca de meios cromogênicos na identificação de *Streptococcus uberis* variaram de 67% em amostras de

MSC a 86% em MC, enquanto que resultados de Sp foram $>95\%$ para MC e de 99% para MSC (Tabela 1). Valores similares foram observados utilizando o kit de diagnóstico VetoRapid (VIO-RA *et al.*, 2014) para identificação de *Streptococcus uberis*, o qual apresentou valores de Se de 84% e Sp de 92%. Para a identificação de *Streptococcus* spp. natriplaca Accumast foram descritos valores de Se = 90% e Sp = 92,9% (GANDA *et al.*, 2016) e Se = 100% e Sp = 93% (FERREIRA *et al.*, 2018). No entanto, não há a diferenciação espécies de *Streptococcus* spp. nos estudos supracitados, o que mostrou ser um diferencial em nosso estudo. Para a identificação de *Enterococcus* spp. a Se variou de 43% (MC) a 50% (MSC) e a Sp foi 98% ambos para MC e MSC. O uso da triplaca Accumast para identificação de *Enterococcus* spp. resultou em valores superiores de Se (87,5%), adicionalmente, foi observado valor semelhante para Sp (94,8%) quando comparado ao nosso estudo (FERREIRA *et al.*, 2018). Por outro lado, a avaliação do kit VetoRapid para identificação de *Enterococcus* spp. resultou em Se (17%), valor inferior ao encontrado em nosso estudo. Contudo, o valor de Sp foi similar (93%) (VIO-RA *et al.*, 2014). A variação de coloração de colônias entre as espécies *Lactococcus garvie* e *Lactococcus lactis* foi um fator limitante para o diagnóstico visual de *Lactococcus* spp. Foram observados resultados FN ($n=8$ para MC/ $n= 25$ para MSC) para *Lactococcus* spp. devido isolados de *Lactococcus garviae* apresentaram crescimento com coloração branca ou translúcida, tanto em amostras de MC quanto de MSC. Um estudo recente utilizando triplaca do *Minnesota Easy System* também relatou a ocorrência de resultados FN em no diagnóstico de *Lactococcus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2018). Acreditamos que esta limitação da variação de coloração das colônias afetou negativamente os resultados de Se de identificação de *Lactococcus* spp. no presente estudo.

Os resultados de Se e Sp do meio cromogênico seletivo para *Staphylococcus* spp. variaram de acordo como tipo de amostra de MC e MSC. A Se para identificação de *Staphylococcus aureus* foi de 86% (MC) e 83% (MSC), enquanto que a Se para identificação de SNA foi de 61% (MC) e 75% (MSC)., O valor de Sp foi $>97\%$ para identificação de *Staphylococcus aureus* e $>95\%$ para SNA, tanto para a MC

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

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

al., 2018).

Para a identificação do grupo *Klebsiella* spp./*Enterobacter* spp., os resultados Se e Sp encontrados no presente estudo foram similares aos descritos na avaliação da triplaca Accumast (GANDA et al., 2016), com Se = 97,8% e Sp = 96,5%. Para identificação dos demais microrganismos Gram-negativos, como *Pseudomonas* spp. foi observado baixa Se nas amostras de MSC (50%). Este resultado de Se pode estar relacionado ao número de FN e o baixo universo amostral (2/3). No entanto, nas amostras de MC, a identificação de *Pseudomonas* spp. apresentou Se = 75% e Sp = 99%, valor abaixo dos resultados descritos por Ganda et al (2016), que observaram Se = 100 e Sp = 99,8%. No presente estudo, houve baixo número de isolamento de *Serratia* spp.

Em relação aos resultados de VPP, foram encontrados valores de 10 a 100% para amostras de MC, e de 14 a 100% para amostras de MSC. Já em relação aos resultados de VPN, houve variação de 96-100% em amostras de MC e de 87-100% para amostras de MSC. Foi observado baixos resultados de VPP para a identificação de *Lactococcus* spp. (10%) e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* (45%) em amostras MC. No entanto, para as amostras de MSC o VPP de identificação de *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* foi de 28% e *Streptococcus uberis* de 59%. Os resultados de VPP de identificação de *Streptococcus uberis* com o kit VetoRapid foram similares ao do presente estudo (VIORA et al., 2016). Para *Staphylococcus aureus* o VPP variou de 67-76% para MC e MSC, respectivamente, o que pode ser considerado similar aos dos estudos prévios, que apresentaram valores de VPP de 49% (MCCARRON et al., 2009), 87,15% (GANDA et al., 2016) e 52% (VIORA et al., 2014). Em relação ao VPN, ocorreu variação de 87-100% entre os microrganismos avaliados em amostras de MC e MSC deste estudo.

Houve variação de resultados de concordância *Kappa* entre a identificação pela triplaca de meios de cromogênicos e a metodologia padrão, de acordo com o tipo de patógeno isolado. Para as bactérias Gram-negativas o valor de *Kappa* variou de $k = 0,07$ para *Serratia* spp. a $k = 0,85$ para *Klebsiella* spp./*Enterobac-*

terspp. em amostras de MC. Já para amostras de MSC os valores de *Kappa* variaram de $k = 0,28$ para *Escherichia coli* a $k = 0,66$ para *Pseudomonas* spp., resultados semelhantes aos descritos para identificação de *Pseudomonas* spp. nos meios de cultura Accumast, $k = 0,66$ (GANDA *et al.*, 2016). Os maiores valores de *Kappa* avaliados como concordância quase perfeita ($k = 0,8-1,0$) foram observados somente para *Klebsiella* spp./*Enterobacter*spp. nas amostras de MC ($k = 0,85$), diferentemente do que foi encontrado nos resultados utilizando bi e triplaca do Minnesota EasyCulture System, apresentando valores de *Kappak* = 0,21 e 0,50 para cada método utilizado (ROYSTER *et al.*, 2014).

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

Avaliação dos meios cromogênicos GP e Staph para identificação de agentes causadores de mastite

Tabela 1. Desempenho diagnóstico de triplaca de meios cromogênicos Strep. Staph. e GN em amostras de leite de vacas com MC (n=476) e MSC (n=500).

Preditores	S. ube. ¹	S. aga/ dys ²	S. au ³	SNA ⁴	Ent. ⁵	Lacto. ⁶	E. coli ⁷	Kleb. ⁸	Prot. Lev ⁹	Pseu. ¹⁰	Serr. ¹¹
Freq (n) ¹²											
MC ²⁰	18	19	24	30	13	2	34	30	3	2	8
MSC ²¹	10	11	35	140	4	8	1	5	.	1	.
Ac% ¹³											
MC	98	95	97	93	97	95	95	98	99	98	99
MSC	98	92	99	87	97	95	99	98	.	100	.
Se% ¹⁴											
MC	86	86	86	61	43	20	79	91	75	18	100
MSC	67	100	83	75	50	24	100	71	.	50	.
Sp% ¹⁵											
MC	99	95	97	97	98	96	96	98	99	100	99
MSC	99	94	98	95	98	100	99	99	.	100	.
Vpp% ¹⁶											
MC	78	45	67	70	23	10	68	79	43	100	67
MSC	59	28	76	89	29	80	14	45	.	100	.
Vpn% ¹⁷											
MC	99	99	99	96	99	98	98	99	100	98	100
MSC	99	100	98	87	99	95	100	100	.	100	.
K(IC 95%) ¹⁸											
MC	0,75	0,53	0,7	0,71	0,12	0,12	0,69	0,85	0,6	0,07	0,78
MSC	0,49	0,33	0,72	0,62	0,33	0,36	0,28	0,55	.	0,66	.
K valor de P ¹⁹											
MC	0,1317	<0,001	0,371	<0,001	0,0007	0,1025	0,079	0,317	0,317	0,025	0,654
MSC	0,0046	<0,0001	0,2971	0,0008	0,0201	<0,0001	0,0253	0,1573	.	0,1573	.

1 Streptococcus uberis; 2 Streptococcus agalactiae/dysgalactiae; 3 Staphylococcus aureus; 4 Staphylococcus não aureus; 5 Enterococcus spp.; 6 Lactococcus spp.; 7 Escherichia coli; 8 Klebsiella spp.; 9 Prototheca spp./Levedura; 10 Pseudomonas spp.; 11 Serratia spp.; 12 Frequência de isolamentos; 13 Acurácia; 14 Sensibilidade; 15 Especificidade; 16 Valor preditivo positivo; 17 Valor preditivo negativo; 18 Teste de concordância Kappade Cohen; 19 Valor de P do Coeficiente Kappa; 20 Amostras de mastite clínica; 21 Amostras de mastite subclínica.

Os meios de cultura cromogênicos GP e Staph foram avaliados quanto ao desempenho para identificação microbiológica em amostras de MSC e amostras de leite provenientes de vacas em PP. Para a avaliação dos preditores de desempenho diagnóstico dos meios de cultura cromogênicos, considerou-se a capacidade de identificação presuntiva de agentes causadores de mastite comparativamente à identificação microbiológica obtida por MALDI-TOF MS.

Em relação ao meio cromogênico GP, foi possível observar elevados valores de Se e SP para o grupo dos “*Streptococcus-likebacteria*” 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*) foram 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 o 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 MCCARRON et al. (2009a) não diferenciaram os grupos *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*, agrupando-os em *Streptococcus* spp. A distinção entre espécies de microrganismos do grupo dos *Streptococcus* spp., novamente mostrou ser um diferencial em nosso estudo. Esta capacidade de diferenciação observada no meio cromogênico GP possibilita a identificação específica do grupo e/ou patógeno e permite a adoção de medidas profiláticas específicas de controle, de acordo com a espécie de *Streptococcus* isolado, visto que existem diferentes níveis de patogenicidade e perfis de transmissão neste grupo de microrganismos. A elevada frequência de isolamento 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 resultados de identificação confiáveis para estes patógenos a partir de amostras PP.

Os valores de VPP foram de baixos a moderados para o grupo dos “*Streptococcus* li-

ke-bacteria” no meio GP, 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). O meio de cultura Acumast (GANDA et al., 2016) e Minnesotaplate (MCCARRON et al., 2009a) apresentaram valores de VPP maiores aos obtidos pelo meio GP, entretanto, nossos resultados foram próximos aos obtidos tanto pela biplaca quanto pela triplaca Minnesota EasyCulture System (ROYSTER et al., 2014).

O resultado de VPN para este grupo de patógenos 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 EasyCulture System para *Streptococcus* spp, e similares aos obtidos pela triplaca Minnesota EasyCulture System (VPN = 90% - 91%; ROYSTER et al., 2014) e pelo método Acumast (VPN = 98,1%; 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%). Acreditamos que os baixos valores de Se possam ser atribuídos a uma inconsistência no padrão de cores gerado para as diferentes linhagens 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), houve o comprometimento do VPP (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 rápi-

da kit VetoRapid(VIORA et al., 2014) e em MC pelas quadriplacas SSGN e SSGNC (Se = 57% e VPP = 53% FERREIRA et al., 2018). Contrariamente aos nossos resultados para amostras de MC no método Accumast (Se = 100% e VPP = 87,5%; GANDA et al., 2016), apresentou resultados elevados de Se e VPP para a identificação de *Staphylococcus aureus*. Em nosso estudo foram utilizadas amostras de leite compostas de casos de MSC. Acreditamos que o efeito de diluição do leite de um quarto mamário infectado, possa resultar em uma menor contagem de unidades formadoras de colônias necessárias para isolamento de microrganismos em relação a amostras de MC, o que poderia explicar a menor capacidade do meio cromogênico GP em identificar *Staphylococcus aureus* a partir de amostras de MSC.

Para o meio Staph, 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). Estes resultados são semelhante aos obtidos pelos métodos Accumast (GANDA et al., 2016) e Minnesota easy-culture system II (ROYSTER et al., 2014). Adicionalmente, o meio Staph permitiu diferenciar outras duas espécies de *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus saprophyticuse Staphylococcus epidermidis*), o que não foi descrito no Minnesota easyculture system II e Accumast. Contudo, devido à baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus saprophyticuse Staphylococcus epidermidis*, não foi possível a determinação dos preditores para essas espécies.

A concordância entre o meio cromogênico GP e a metodologia padrão, representado pelo coeficiente *Kappa*, foi substancial para os grupos de patógenos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* ($k= 0,76$) e *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. ($k= 0,70$) para amostras de MSC. Em amostras de PP, para os mesmos grupos de patógenos, também se obteve concordância substancial ($k= 0,72$) para *Streptococcus uberis/Enterococcus* spp. e ($k= 0,69$) para *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*. A concordância observada no presente estudo foi superior à obtida para *Streptococcus* spp.

pelasbiplaca e triplaca Minnesota EasyCulture System (ROYSTER et al., 2014), porém foi ligeiramente inferior à obtida pelo Accumast ($k = 0,91$; GANDA et al., 2016). No entanto, nenhum destes métodos permite a diferenciação dos *Streptococcus* por espécie, como descrito no meio cromogênico GP.

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* ($k= 0,30$), o que corrobora os resultados insatisfatórios da Se (25,0%) e VPP (38,5%). Para amostras de PP a concordância foi moderada ($k = 0,49$). Os resultados de concordância foram inferiores aos obtidos pelos métodos Accumast ($k = 0,93$) (GANDA et al., 2016) e pelasbiplaca e triplaca Minnesota EasyCulture System ($k = 0,62$ e $k = 0,49$; 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 Staph obteve concordância substancial na identificação rápida de *Staphylococcus aureus* tanto para amostras de MSC ($k= 0,72$) quanto para amostras de PP ($k= 0,79$). Nossos resultados foram ligeiramente inferiores à concordância quase perfeita obtida por Accumast ($k = 0,93$; GANDA et al., 2016) em amostras de MC. Acreditamos que este nível de concordância possa 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 Staph foi superior às concordâncias obtidas pela biplaca e triplaca Minnesota EasyCulture System ($k = 0,56 - 0,63$ e $k = 0,59 - 0,6$ respectivamente; ROYSTER et al., 2014), triplacascromogênicas CHROMagar Mastitis, HardyDiagnosticsMastitis Triplate e VetoRapid($k = 33$; $k = 34$; $k = 40$ respectivamente; GRIFFIOEN et al., 2018), indicando alta concordância entre o método de referência e a identificação presuntiva do meio Staph 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 Staph e a metodologia padrão na identificação destes patógenos.

CONCLUSÃO

O uso dos meios de cultura cromogênicos possibilita a identificação rápida (de 18 a 24 h) dos principais agentes causadores de mastite. A identificação microbiológica rápida de agentes causadores de mastite em nível de grupo ou espécie, sem a necessidade de testes bioquímicos adicionais, imprime velocidade na tomada de decisão sobre tratamentos e medidas de controle da mastite nos rebanhos, o que possibilita o uso racional dos antimicrobianos.

Considerando os resultados obtidos nos três estudos, os meios de cultura cromogênicos testados (GP, GN, Staph e Strep) apresentaram, de forma geral, desempenho diagnóstico satisfatório para os patógenos aos quais se propõem a identificar. O meio cromogênico GP, assim como o meio Strep, apresentaram valores elevados para os preditores de desempenho diagnóstico na identificação de *Streptococcus* spp., permitindo a diferenciação visual entre os grupos *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. O meio cromogênico Staph apresentou valores elevados para os preditores de desempenho diagnóstico na identificação de *Staphylococcus aureus*, permitindo diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e SNA, o que é fundamental para a adoção de medidas de controle do patógeno na fazenda. De forma geral o meio cromogênico GN apresentou desempenho satisfatório para identificação de bactérias Gram-negativas, *Prototheca* spp. e Leveduras. A baixa Se da identificação de *Staphylococcus aureus* no meio cromogênico GP, assim como a baixa Se para *Lactococcus* spp. podem ser citados como limitações dos meios avaliados nos estudos.

Conclui-se que os meios cromogênicos testados apresentaram, de forma geral, desempenho similar a outras metodologias de identificação microbiológica rápida utilizadas em SCF, com a vantagem de possibilitar diferenciação

em nível de espécie para alguns membros dos grupos *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Os resultados indicam que os meios cromogênicos testados podem ser alternativa viável para a implementação de SCF.

REFERÊNCIAS

FERREIRA, J. C.; GOMES, M. S.; BON-SAGLIA, E. C. R.; CANISSO, I. F.; GARRETT, E. F.; STEWART, J. L.; ZHOU, Z.; LIMA, F. S. 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.

GANDA, E. K.; BISINOTTO, R. S.; DECTER, D. H.; BICALHO, R. C. 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.

GRANJA, B. M. Avaliação de meios de cultura cromogênicos para identificação rápida de microrganismos causadores de mastite bovina Pirassununga Pirassununga. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

GRIFFIOEN K, A. G.J. VELTHUIS, L.A. LAGERWERF, A.E. HEUVELINK, T. J. G. M. L. 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.

LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. 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, 2011.

MCCARRON, J. L.; KEEFE, G. P.; MCKENNA, S. L. B.; DOHOO, I. R.; POOLE, D. E. 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.; KEEFE, G. P.; MCKENNA, S. L.; DOHOO, I. R.; POOLE, D. E. 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.

PARKER, K. I.; COMPTON, C. W. R.; ANNIS, F. M.; HEUER, C.; MCDOUGALL, S. 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. crossm A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics impact of laboratory automation on the use of chromogenic media . 468. v. 30, n. 2, p. 449–479, 2017.

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.

ROYSTER, E.; GODDEN, S.; GOULART, D.; DAHLKE, A.; RAPNICKI, P.; TIMMERMAN, J. 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*, n. August 2016, 2014.

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

TOMAZI, T.; FERREIRA, G. C.; ORSI, A. M.; GONÇALVES, J. L.; OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; MORONI, P.; SANTOS, M. V. SC. Preventive Veterinary Medicine, 2018.

VIORA, L.; GRAHAM, E. M.; MELLOR, D. J.; REYNOLDS, K.; SIMOES, P. B. A.; GERAGHTY, T. E. Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis. *Veterinary Record*, v. 175, n. 4, p. 89, 2014.