

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO
CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE MASTITE
SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE

FAUSTO RIBEIRO FONSECA

Botucatu – SP
Setembro, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO
CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE MASTITE
SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE

FAUSTO RIBEIRO FONSECA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Carlos de
Figueiredo Pantoja

F676a	Fonseca, Fausto Ribeiro Acurácia diagnóstica de meio cromogênico para detecção de mastite subclínica causada por <i>Streptococcus agalactiae</i> / Fausto Ribeiro Fonseca. -- Botucatu, 2022 64 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja 1. Mastite. 2. Diagnóstico microbiológico. 3. <i>Streptococcus</i>. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nome do Autor: Fausto Ribeiro Fonseca

Título: ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DE MEIO CROMOGÊNICO PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Ass. Dra. Vera Lucia Moraes Rall

Membro

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas

IBB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 02 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conduzir minha vida, sendo a razão pela qual estou aqui.

Aos meus pais, Rui e Ana, e minha irmã, Moema, sou sempre grato pelo incentivo e apoio em minhas escolhas, por não medirem esforços para me auxiliar, e pelo compromisso em ser uma família de amor e união que me sustenta.

À minha tia Lô pelas orações no início dessa jornada e pelo carinho comigo, até seus últimos dias.

Ao meu orientador, professor Pantoja, agradeço primeiramente pela confiança depositada em mim, pela disponibilidade e acessibilidade em todas as ocasiões profissionais e pessoais, e reconheço todos esforços e ajudas para que aqui chegássemos. Ainda sou grato, Professor, pelo exemplo de ética e responsabilidade que nos inspira.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo companheirismo e por toda ajuda.

À FMVZ-UNESP Botucatu, seus professores e funcionários por formarem uma instituição tão conceituada, que me proporcional tal oportunidade.

Aos proprietários e funcionários das fazendas, por nos receberem e permitirem que realizássemos as atividades de pesquisa.

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1. Acurácia de diferentes testes diagnósticos para identificação de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite de vacas.....22

Tabela 2. Prevalência e acurácia diagnóstica de diferentes sistemas de cultura na fazenda para diagnóstico de *Streptococcus* spp.....28

Capítulo 2

Table 1. Microbiological results of milk samples cultured on the Accumast Plus™ plate, blood agar, and isolates subjected to MALDI-TOF MS identification.....47

Table 2. Diagnostic accuracy parameters (%) (95% confidence intervals) of milk culturing on the Accumast Plus™ plate for detection of *S. agalactiae* from quarter and composite milk samples.....48

Table 3. Contingency tables used to calculate the diagnostic accuracy parameters for milk culturing on the Accumast Plus™ plate for the detection of *Streptococcus agalactiae* from quarter and composite milk samples.....49

Table 4. Prevalence and sensitivity of milk culturing on the Accumast Plus™ plate for detection of *Streptococcus agalactiae* from quarter and composite milk samples, by farm.....50

Table 5. Association between the colony colors observed on the Accumast Plus™ plate and the results of the gold standard method (MALDI-TOF MS), by quarter and composite milk samples.....51

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Colônias em placa Accumast™ (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY). A) Placa sem crescimento bacteriano; B) *Staphylococcus aureus*, C) *Staphylococcus epidermidis*; D) *Staphylococcus chromogenes*; E) *Streptococcus agalactiae*; F) *Streptococcus dysgalactiae*; G) *Streptococcus uberis*; H) *Enterococcus faecalis*; I) *Escherichia coli*; J) *Klebsiella oxytoca* e K) *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Ganda et al., (2016).....25

Capítulo 2

Figure 1. Accumast Plus™ plate (FERA Diagnostics and Biologicals, College Station, USA). Growth of blue colonies the selective medium for isolation of *Streptococcus agalactiae* (upper quadrant) and *Streptococcus* spp (lower quadrant).....52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CBT = Contagem Bacteriana Total

CCS = Contagem de Células Somáticas

CMT = *California Mastitis Test*

Ct = *Cycle Threshold*

ES = Especificidade

FN = Falso Negativo

FP = Falso Positivo

GN = Microrganismos Gram-negativos

GP = Microrganismos Gram-positivos

IIM = Infecção intramamária

IM = Intramuscular

IMM = Intramamária

MALDI-TOF MS = Espectrometria de Massa de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo

MC = Mastite clínica

MSC = Mastite subclínica

PCR = Reação em cadeia da polimerase

qPCR = PCR em tempo real

SE = Sensibilidade

SGB = *Streptococcus* grupo B

VPN = Valor Preditivo Negativo

VPP = Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
CAPÍTULO 2 – Trabalho científico	29
ABSTRACT.....	31
CAPÍTULO 3.....	53
DISCUSSÃO GERAL	53
CONCLUSÃO GERAL.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO I – Normas de publicação da revista Journal of Dairy Science	62

FONSECA, F. R. **Acurácia diagnóstica de meio cromogênico para detecção de mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae***. Botucatu, 2022. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia diagnóstica do meio cromogênico Accumast Plus™ para identificação de mastite causada por *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite bovino de quartos mamários e compostas. Cinco rebanhos foram visitados uma única vez para colheita de leite de todos os quartos mamários (N=467) das vacas (N=118) em lactação. As amostras de quarto foram cultivadas simultaneamente em placas Accumast Plus™ e ágar sangue, das quais os isolados foram enviados para identificação por MALDI-TOF MS (padrão ouro). Amostras compostas foram preparadas e cultivadas nas placas Accumast Plus™. Foram adotados dois pontos de corte: I) crescimento de ≥ 1 colônia azul (definição do fabricante) e II) crescimento ≥ 1 colônia azul, branca ou lilás. A prevalência de *S. agalactiae* nas amostras de quarto foi de 18,44% (83/450). A concordância entre os observadores foi quase perfeita (Kappa = 0,97 e 0,95) para o diagnóstico de *S. agalactiae* e identificação das cores das colônias. A acurácia da cultura de amostras de quarto na placa Accumast Plus™ (ponto de corte I) foi: sensibilidade (SE) = 60,02%, especificidade (ES) = 97,97%, valor preditivo positivo (VPP) = 85,88% e valor preditivo negativo (VPN) = 92,04%. No ponto de corte II, os parâmetros foram: SE = 73,50%, ES = 97,97%, VPP = 87,89% e VPN = 93,83%. Para as amostras compostas, não houve perdas significantes de acurácia. A SE observada resultou em alta probabilidade de resultados falso negativos (20,00 – 39,98%), o que poderia aumentar o risco de disseminação do agente nos rebanhos.

Palavras-chave: mastite bovina, cultura na fazenda, Accumast Plus™, estreptococos

FONSECA, F. R. **Diagnostic accuracy of chromogenic medium for detection of subclinical mastitis caused by *Streptococcus agalactiae***. Botucatu, 2022. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the accuracy of Accumast Plus™ to identify mastitis caused by *Streptococcus agalactiae* in quarter and composite milk samples. Five herds were visited once to collect milk from all mammary quarters (N=467) of the lactating cows (N=118). Quarter samples were cultured simultaneously on Accumast Plus™ and blood agar, from which the isolates were diagnosed by MALDI-TOF MS (gold standard). Composite samples were prepared and plated on Accumast Plus™. Two cut-off points were adopted: I) growth of ≥ 1 blue colony (manufacturer's definition) and II) growth of ≥ 1 blue, white, or purple colony. The quarter-level prevalence of *S. agalactiae* was 18.44% (83/450). The agreement between observers was almost perfect (Kappa = 0.97 and 0.95) for diagnosis of *S. agalactiae* (yes or no) and identification of colony colors. The accuracy of culturing quarter milk samples on Accumast Plus™ (cut-off point I) was: sensitivity (SE) = 60.02%, specificity (ES) = 97.97%, positive predictive value (PPV) = 85.88 % and negative predictive value (VPN) = 92.04%. At cut-off point II, the parameters were: SE = 73.50%, ES = 97.97%, PPV = 87.89% and NPV = 93.83%. For the composite samples, there was no significant loss of accuracy. The observed SE resulted in a high probability of false-negative results (20.00 - 39.98%), which could increase the risk of spreading the pathogen within the herd.

Keywords: bovine mastitis, on-farm culture, Accumast Plus™, streptococci

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae pode causar doenças em diferentes espécies, incluindo humanos, bovinos e peixes. Em vacas leiteiras é um dos principais agentes causadores de mastite contagiosa, cujo potencial de transmissão entre bovinos e humanos tem sido investigado recentemente (SØRENSEN *et al.*, 2019). De infecção primariamente intramamária e de caráter contagioso, a persistência da infecção aliada às más práticas higiênicas de ordenha e ausência de programas de controle da mastite, possibilitam a disseminação do agente pelo plantel (KEEFE, 1997).

O patógeno ainda é prevalente em diversas regiões, como no Sul de Minas Gerais, onde MESQUITA *et al.* (2019) encontraram o patógeno no leite do tanque de 67% dos 306 rebanhos avaliados.

A mastite subclínica por *S. agalactiae* resulta em aumento da contagem de células somáticas (CCS) e diminuição da produção de leite em 1,24 Kg/dia no período entre dois a três meses após a infecção (HOLMØY *et al.*, 2019).

Em programas de controle sistemáticos que incluem diagnóstico, segregação e tratamento das vacas infectadas, o agente pode ser erradicado do rebanho, uma vez que é sensível a antimicrobianos como a penicilina (KEEFE, 1997). Em geral, as taxas de cura após tratamento intramamário (IMM) são altas, da ordem de 90,4% com cloxacilina e ampicilina (REYES *et al.*, 2015), 85,9% com cloxacilina e 98% com cefquinoma (ROSSI *et al.*, 2019). Após o tratamento, é importante repetir a cultura para reintrodução dos animais curados no rebanho sadio (REYES *et al.*, 2015), em virtude da possível permanência de animais que atuam como fontes de infecção.

A aquisição de animais infectados pode reintroduzir o patógeno em rebanhos livres, considerado problema emergente em países desenvolvidos como a Dinamarca (CHURAKOV *et al.*, 2021) e a Noruega (HOLMØY *et al.*, 2019).

A mastite subclínica (MSC) é comumente diagnosticada pelo aumento da CCS (PYÖRÄLÄ, 2003), porém esse método não identifica o patógeno. A diferenciação do agente etiológico, incluindo pela cultura laboratorial padrão, permite tomada de decisão direcionada. Em estudo realizado com 167 vacas, Dinsmore *et al.* (1991) observaram a SE (sensibilidade) e ES (especificidade) da cultura microbiológica do leite no diagnóstico de *S. agalactiae* de 98,8% e 100% para amostras de quarto mamário, e 96,5% e 100% para amostras compostas (mistura do leite de todos os quartos).

A cultura na fazenda é uma prática adotada em propriedades leiteiras com o intuito de diagnosticar em até 24 horas a etiologia dos casos de mastite clínica (MC) (LAGO *et al.*, 2011). O interesse em diferenciar micro-organismos Gram-negativos (GN), estafilococos e estreptococos tem estimulado o desenvolvimento de diferentes meios cromogênicos (FERREIRA *et al.*, 2018). Os meios cromogênicos têm a finalidade de rápida identificação presuntiva. São compostos por substratos enzimáticos que, quando hidrolisados, coram as colônias-alvo, distinguindo-as facilmente (PERRY E FREYDIÈRE, 2007).

A placa Accumast™ (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY) para cultura na fazenda apresenta três meios de culturas cromogênicos seletivos para estafilococos, estreptococos e GN. Ganda *et al.* (2016) observaram SE de 90% e ES de 92,9% para o diagnóstico de *Streptococcus* spp. (249 isolados). Apesar de as colônias de *S. agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* crescerem em tons da cor azul, não foi possível distingui-los pela cor. A ausência de um sistema com diagnóstico preciso de *S. agalactiae* pela cor tem impossibilitado o uso da cultura na fazenda em programas de erradicação.

Recentemente a placa Accumast Plus™ (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY) foi disponibilizada comercialmente no Brasil, contendo meio cromogênico seletivo para *S. agalactiae*. No entanto, é necessária evidência científica para validar a sua acurácia diagnóstica em nível de fazenda.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a acurácia diagnóstica da cultura do leite em placa Accumast Plus™ para detecção de mastite subclínica causada por *S. agalactiae*. Ademais, a acurácia da placa de cultura foi comparada entre amostras de leite de quartos mamários e compostas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A mastite bovina é a doença mais comum e impactante economicamente em rebanhos leiteiros de todo o mundo. Com prevalência mundial estimada de 42%, a MSC é geralmente diagnosticada por testes como o *California Mastitis Test* (CMT) e a CCS. Em contrapartida, a MC, normalmente identificada pela inspeção visual do leite e da glândula mamária durante o processo de ordenha, apresenta prevalência estimada de 15% (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2021).

No Brasil, com base em um ponto de corte da CCS de 200.000 células/mL, Busanello *et al.* (2017) estudaram medidas de ocorrência de MSC em 517 rebanhos de três regiões. Os autores reportaram prevalência de 46,4%, incidência de 0,17% novos casos por vaca/mês, além de observarem tendência de aumento desses índices ao longo dos anos, independentemente da região e tamanho do rebanho.

S. agalactiae, classificado como *Streptococcus* grupo B (SGB), é um agente que infecta várias espécies, sendo mais impactante em humanos, bovinos e peixes. O patógeno é responsável por patologias como doença invasiva em humanos recém-nascidos e mastite em bovinos (CHEN, 2019).

Em estudo realizado na Dinamarca, Sørensen *et al.* (2019) avaliaram isolados de SGB de oito rebanhos coletados de diferentes fontes, tais como leite, *swabs* retais e vaginais de 243 vacas em lactação, *swabs* retais e orofaríngeos de 42 funcionários e *swabs* de equipamentos de ordenha. Os resultados do sequenciamento do genoma completo mostraram que dentro de uma mesma fazenda, clones de SGB isolados de humanos e bovinos compartilharam até 98,5% do genoma, sugerindo capacidade de transmissão entre as espécies.

2.1. Mastite por *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae é conhecido como importante agente causador de MSC, de origem contagiosa, que possui a glândula mamária como nicho de predileção.

Patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* e *S. agalactiae*, têm como via de disseminação o contato vaca a vaca por meio de ordenha e fômites. Por essa razão, a adoção de práticas de manejo tais quais o pós-dipping, segregação de animais infectados, manutenção e higiene dos equipamentos de ordenha e uso de luvas, possuem efeito preventivo na transmissão entre os animais (KEEFE, 2012). Maiores taxas de

contágio foram observadas em rebanhos ordenhados por robôs do que naqueles ordenhados de forma convencional, devido a falhas de higienização dos tetos, limpeza da ordenha e detecção de casos clínicos (DENG *et al.*, 2021). No mesmo estudo foram reportadas taxas de transmissão de *S. agalactiae* que variaram entre 0,007 e 0,019 casos/dia e duração média da infecção intramamária (IIM) entre 86 e 95 dias.

A persistência de IIM por *S. agalactiae* foi avaliada em um rebanho na Tailândia, com prevalência de 63% e 36% de vacas e quartos infectados, respectivamente, no qual condutas básicas de rotina, como segregação de animais, pré-*dipping* e manutenção de equipamentos, não eram realizadas. Foram incluídas 546 amostras de 19 vacas que apresentaram 49 casos de mastite ao longo de dez meses. A duração média das infecções foi de 270,84 dias e a persistência de IIM que não apresentaram cura espontânea ao longo dos dez meses foi 80% (LEELAHAPONGSATHON *et al.*, 2016).

Como a porta de entrada é o canal do teto, a relação entre a colonização do teto e o estabelecimento de IIM foi estudada por Svennesen *et al.* (2018) em 300 vacas com CCS > 200.000 células/mL, oriundas de oito rebanhos infectados por *S. agalactiae*. O patógeno foi isolado por cultura em 7,4% (N=84) das amostras de leite, em 0,35% (N=4) dos *sawbs* da pele dos tetos e em 0,26% (N=3) em ambos. Pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (N=287 quartos), *S. agalactiae* foi isolado em 14% das amostras de leite e 18% dos *swabs* de teto, mostrando a importância da higiene do teto, que serve como reservatório do patógeno.

Além da transmissão via ordenha, de forma contagiosa, outro ciclo de natureza ambiental tem sido proposto na epidemiologia da mastite por *S. agalactiae*, que se caracteriza pela presença do patógeno no intestino e eliminação fecal, podendo resultar em novas IIM decorrentes da exposição ambiental. Assim, o ciclo oro-fecal é potencial reservatório do agente na propriedade (JØRGENSEN *et al.*, 2016).

Cobo-ángel *et al.* (2018), em 25 fazendas na Colômbia encontraram *S. agalactiae* em 13% (207/1.712) de amostras de leite de vacas, 2% (32/1.545) em *swabs* retais e 2% (3/181) em *swabs* ambientais coletados de cochos e bebedouros. A presença de isolados em amostras ambientais indica que *S. agalactiae* não é um patógeno exclusivamente intramamário e sugere diferenças entre isolados na capacidade de sobreviver no ambiente.

O diagnóstico e tratamento simultâneo de todos os animais infectados com *S. agalactiae*, assim como a remoção daqueles que não respondem à terapia, são primordiais para a erradicação. Contudo, a aquisição de vacas infectadas pode colocar o trabalho em

risco, reintroduzindo o patógeno no rebanho. Caso a compra dessas se faça necessária, é primordial a implantação de protocolo de biossegurança (KEEFE, 2012).

Outro exemplo da importância da continuidade dos programas de erradicação é o ressurgimento do patógeno na Noruega (HØLMOY *et al.*, 2019) e Dinamarca (CHURAKOV *et al.*, 2021), onde um programa conseguiu com êxito, que muitas fazendas ficassem livres do agente no século passado. Porém, no início dos anos 2.000 observou-se reemergência do patógeno associada geograficamente à aquisição de vacas, mostrando a importância de manter os rebanhos fechados e da restrição da movimentação de animais (CHURAKOV *et al.*, 2021).

O impacto da IIM por *S. agalactiae* na produção de leite e CCS foi avaliado em 150 rebanhos (15.757 vacas e 30.850 lactações) na Noruega por HØLMOY *et al.* (2019). Os resultados revelaram que a produção de leite diária entre dois e três meses após a diagnóstico da IIM foi 1,24 kg menor em vacas infectadas, em relação às não infectadas, o que foi observado até o final da lactação. As vacas tratadas recuperaram 0,8 kg de leite/dia entre 30 e 60 dias, em relação às vacas não tratadas. A CCS média das vacas não infectadas foi de 183.000 células/mL, enquanto as infectadas apresentaram aumento da CCS para 260.000 células/mL entre dois e três meses antes do diagnóstico e para 364.000 células/mL no mês anterior ao diagnóstico. Ao longo da lactação, os animais tratados apresentaram diminuição média de 152.000 células/mL em até três meses após o tratamento, em relação às vacas não tratadas.

Ma *et al.* (2000) analisaram amostras de leite de oito vacas antes e depois de apresentarem mastite por *S. agalactiae*, as quais apresentaram aumento médio da CCS de 45.000 para 849.000 células/mL. Quanto a qualidade do leite pasteurizado, identificaram diminuição da qualidade sensorial e nutricional, em decorrência do aumento dos processos de lipólise e proteólise.

A elevação da CCS e da Contagem Bacteriana Total (CBT) no leite resulta em menor rendimento na produção de derivados, menor vida de prateleira e alterações organolépticas. Assim, a indústria de laticínios adota práticas de pagamento por qualidade, que impulsiona o controle da mastite e demais boas práticas de ordenha (KEEFE, 1997). Mesquita *et al.* (2019) estudaram 306 rebanhos (34.000 vacas) fornecedores de um laticínio no sul de Minas Gerais com objetivo de avaliar a prevalência de *S. agalactiae* e as implicações na CCS, CBT e produção leiteira. A prevalência de *S. agalactiae* em amostras do leite do tanque de refrigeração foi de 67% (205/306). A CCS e a CBT média no leite foram 503.000 células/mL e 46.000 ufc/mL em rebanhos positivos

e 442.000 células/mL e 38.000 ufc/mL em rebanhos negativos, sugerindo o impacto negativo do agente na qualidade do leite.

S. agalactiae ainda é prevalente em algumas regiões do mundo. No Brasil, Rossi *et al.* (2018) observaram prevalência de 25,6% em vacas e 13,0% em quarto, em 304 vacas de rebanhos dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Na Colômbia, Cobo-Ángel *et al.* (2018) reportaram prevalência de 13% em 1712 vacas. Na Noruega, resultados de cultura microbiológica de amostras colhidas durante programa de vigilância e cultivadas pelo Instituto Veterinário Norueguês, revelaram prevalência em nível de vaca de 6,4% (HØLMOY *et al.*, 2018).

2.1.1. Tratamento

S. agalactiae pode ser erradicado do rebanho baseado em programa sistemático de diagnóstico e tratamento simultâneo de todos os animais infectados (*blitz* terapia), uma vez que é sensível a antimicrobianos como os beta-lactâmicos (KEEFE, 1997).

Previamente ao tratamento da MSC por *S. agalactiae*, todas as vacas positivas (identificadas por meio de cultura microbiológica) devem ser segregadas em lote a ser ordenhado no final da linha de ordenha. Vacas no final da lactação devem ser secas com antimicrobianos, não justificando o tratamento em lactação. A *blitz* terapia deve ser empregada às demais vacas, consistindo no tratamento simultâneo de todas as vacas positivas, as quais devem permanecer separadas do rebanho até estarem livres da infecção (EDMONDSON, 2011).

Após o tratamento é necessária a confirmação da cura bacteriológica por meio da cultura do leite, em aproximadamente 14 dias a partir do término da terapia (ROSSI *et al.*, 2019). As vacas curadas devem ser reintroduzidas no rebanho sadio e aquelas não curadas podem ser submetidas novamente ao tratamento ou removidas do rebanho (REYES *et al.*, 2015).

Em estudo realizado na Colômbia, Reyes *et al.* (2015) compararam a eficácia das vias de administração de antimicrobianos (IMM versus intramuscular (IM)) em regimes de *blitz* terapia. Foram incluídos 17 rebanhos, nos quais vacas identificadas com mastite por *S. agalactiae* foram randomizadas e submetidas a tratamento com uma combinação IMM de cloxacilina e ampicilina em todos os quartos (N=125), ou com hidroiodeto de penetamato pela via IM (N=123). A taxa de cura foi maior no tratamento IMM (82,4%) do que com o tratamento IM (65,8%).

No Brasil, Rossi *et al.* (2019) randomizaram vacas com mastite por *S. agalactiae* de nove rebanhos comerciais, para avaliar a eficácia de três regimes de tratamento em relação a um grupo não tratado: 1) cloxacilina IMM (N=94 quartos); 2) cefquinoma IMM (N=100 quartos); 3) cefquinoma IM (N=31 quartos); 4) controle negativo. As taxas de cura bacteriológica, avaliadas 14 dias após o final do tratamento, foram de 86,02%, 97,89%, 54,84% e 25,00%, respectivamente.

Yamagata *et al.* (1987) avaliaram a viabilidade econômica da *blitz* terapia, por meio do custo-benefício em relação ao custo do tratamento comparado à produção de leite, comparando vacas que foram tratadas e curadas (98% de cura) de IIM por *S. agalactiae*, com vacas permanentemente infectadas. O tratamento de vacas no início, meio ou final da lactação apresentou custo-benefício de US\$ +396,00, US\$ +237,00, e US\$ -55,00 dólares, respectivamente.

Além do retorno do investimento realizado com o tratamento, devido ao aumento de produção, pode-se observar aumento crescente da concentração de gordura no leite (EDMONDSON, 1989). Em estudo realizado por Erskine *et al.* (1990), a *blitz* terapia resultou na diminuição da prevalência de *S. agalactiae* de 41,6% a 4,2%, em período de um ano, observando-se aumento de 512 kg/leite/vaca e 14 kg de gordura na lactação subsequente ao tratamento. A CCS do leite do tanque diminuiu de 918.000 para 268.000 células/mL em um ano.

2.2. Diagnóstico

A MSC pode ser diagnosticada por métodos baseados em duas vertentes. Os testes baseados na contagem de células inflamatórias no leite, tais quais a CCS e o CMT, são mais simples e baratos e, por essa razão, são de uso na rotina, principalmente em programas de triagem. A segunda possibilidade é baseada na identificação do patógeno, com a cultura microbiológica e métodos por biologia molecular, os quais possibilitam tomada de decisão direcionada segundo a etiologia (PYÖRÄLÄ, 2003).

2.2.1. Diagnóstico pelo aumento da concentração de células no leite

O aumento da concentração de células no leite é influenciado por fatores como dias em lactação, número de lactações, dieta e idade, mas principalmente, pela presença de neutrófilos da corrente sanguínea, em resposta à infecção. Assim a CCS é um método bastante usual para diagnosticar a mastite (PYÖRÄLÄ, 2003).

No Brasil Rossi *et al.* (2018) avaliaram a acurácia diagnóstica do CMT e do Somaticell™ (em relação à cultura microbiológica) para identificação de quartos infectados com *S. agalactiae* em sete rebanhos (N=304 vacas) com isolamento prévio de *S. agalactiae* do leite do tanque. A sensibilidade e especificidade do CMT para os pontos de corte “suspeito” e escore 1 variaram entre 91,9% e 90,6% de sensibilidade e 82,7% e 91,0% de especificidade, respectivamente. Para o teste Somaticell™, nos pontos de corte de 147.000 e 205.000 células/mL, a sensibilidade variou entre 98,8% e 96,6% e a especificidade entre 72,6% e 80,7%, respectivamente, demonstrando a alta acurácia dos testes baseados em CCS na identificação de quartos mamários infectados.

2.2.2. Amostras de quarto mamário e compostas

Como alternativa ao uso de amostras individuais de quartos mamários, pode-se utilizar uma única amostra por vaca, composta do leite de todos os quartos funcionais. As amostras compostas possuem menor custo e maior praticidade de colheita, sendo úteis para o diagnóstico inicial e monitoramento epidemiológico dos principais patógenos presentes no rebanho. Uma possível desvantagem das amostras compostas é a diminuição da acurácia diagnóstica devido a diluição do leite dos quartos infectados com leite dos quartos sadios, resultando em menor concentração bacteriana no leite do quarto(s) infectado(s). No entanto, devido à alta concentração de *S. agalactiae* observada em quartos infectados, há pouca perda de sensibilidade em relação à cultura do leite de quartos (Dinsmore *et al.*, 1991).

Rossi *et al.* (2018) avaliaram resultados de cultura microbiológica de amostras de leite compostas, tendo amostras de quarto como padrão ouro, para diagnóstico de *S. agalactiae*. A sensibilidade e a especificidade encontradas foram de 95,6% e 99,5%, respectivamente, concluindo que amostras compostas são uma alternativa viável para diagnóstico de *S. agalactiae* em rebanhos comerciais.

Em quatro fazendas (N= 167) com histórico de mastite por *S. agalactiae*, Dinsmore *et al.* (1991) compararam amostras de quarto e compostas colhidas antes e depois da ordenha. A prevalência encontrada foi de 51,5% (86/167). Os resultados das amostras colhidas antes da ordenha apresentaram sensibilidade e especificidade de 98,8% e 100% para amostras de quarto e 96,5% e 100% para amostras compostas, respectivamente, enquanto para as amostras colhidas pós-ordenha, os valores foram 97,7% e 98,8% para amostras de quarto e 96,5% e 98,8% para as compostas, respectivamente.

2.2.3. Cultura microbiológica do leite

A cultura microbiológica do leite é um método rotineiro para diagnóstico de patógenos da mastite em rebanhos comerciais. Em nível de pesquisa, o método foi utilizado em vários estudos (Mahmmod *et al.*, 2013; Leelahapongsathon *et al.*, 2016; Sevensen *et al.*, 2018) para diagnosticar *S. agalactiae*. e comparar com outras metodologias como PCR.

2.2.4. Diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* em meios cromogênicos

Meios cromogênicos têm a finalidade de rápida identificação presumida de patógenos. São compostos por substratos enzimáticos que, quando hidrolisados, assumem coloração específica sobre as colônias-alvo, distinguindo-as facilmente. Porém, raramente um patógeno produz uma enzima exclusiva. Assim a adição de um substrato cromogênico complementar por vezes se faz necessário. Nesses casos a coloração resultante é combinação de cores ou, ainda possibilitou que micro-organismos secundários sejam isolados em tonalidade distinta. Devido à produção de enzimas semelhantes, a inibição de outras bactérias é ideal, sendo bem empregado o uso de agentes seletivos (PERRY e FREYDIÈRE, 2007).

O cromógeno, produto do substrato hidrolisado, deve ser visualizado somente nas colônias cujas bactérias conseguiram quebrá-los, destacando os patógenos dos demais isolados. Os substratos hidroxílicos, quando hidrolisados pelas enzimas bacterianas liberam indoxil. Essas moléculas são dimerizadas na presença de oxigênio, formando corantes índicos de cores vivas. A halogenação dessas moléculas tem efeito dramático na cor, onde 5-bromo-4-cloro-indoxil forma cor azul/verde, já 5-bromo-6-cloro-indoxil gera cor magenta. Os glicosídeos indoxílicos são bastante empregados devido a fácil disponibilidade comercial, alta sensibilidade e baixa toxicidade (PERRY e FREYDIÈRE, 2007).

Streptococcus grupo B é capaz de colonizar a vagina de mulheres e, durante a gravidez, chegar ao líquido amniótico por via ascendente e ser ingerido pelo feto, causando doença invasiva responsável pela morte de recém-nascidos. O uso de meios cromogênicos auxiliam no diagnóstico do agente no início da gestação, possibilitando a instituição de medidas de diminuição da carga microbiana (PERRY, 2017).

Um meio protótipo produzido pela bioMérieux (França), chamado meio B, foi o primeiro meio cromogênico para identificação de SGB. Em estudo realizado no Reino Unido, no qual foram analisados 195 swabs vaginais de mulheres gestantes, o meio B

resultou em 100% de sensibilidade e especificidade para distinção entre presença ou ausência de SGB (PERRY *et al.*, 2006).

Salem e Anderson (2015), na Austrália, avaliaram a acurácia de quatro meios cromogênicos para o diagnóstico de *S. agalactiae* isolados de 242 *swabs* vaginais de mulheres gestantes, tendo como padrão ouro a cultura em ágar sangue pré-enriquecida em caldo Lim com confirmação por Espectrometria de Massas de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF MS), sendo esse o método indicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Os resultados revelaram 50 amostras positivas, com as seguintes sensibilidades: Brilliance GBS = 96%; CHROMagar = 94%; StrepB Select = 92%; ChromID Strepto B = 86%. A especificidade e o valor preditivo positivo (VPP) foram de 100% para todos os testes. Os autores concluíram que os meios cromogênicos foram tão acurados quanto o método recomendado, porém com o benefício de serem mais práticos.

Embora os estudos supracitados demonstrem que os meios cromogênicos possuem acurácia diagnóstica adequada para utilização em humanos, poucos estudos foram realizados para validar o diagnóstico de *S. agalactiae* por meio da cultura do leite de casos de mastite bovina.

2.2.5. Reação em cadeia de polimerase

Métodos de biologia molecular ganham cada vez mais espaço no diagnóstico de agentes etiológicos da mastite, como a PCR em tempo real (qPCR), técnica rápida e acurada para identificar micro-organismos diretamente do leite. A PCR identifica genes específicos de DNA que sofreu multiplicações em cada ciclo do teste, até atingir o *Cycle Threshold* (Ct), que é o número de ciclos que possibilita a identificação do patógeno na amostra (LANGE *et al.*, 2017). Para que a síntese do *amplicon* aconteça é necessário a adição de *primers* próprios (GURJAR *et al.*, 2012).

Em razão de identificar DNA, amostras possivelmente contaminadas, por apresentarem micro-organismos que não sejam de IIM, são consideradas positivas. Enquanto esse pode ser um problema para o diagnóstico de patógenos de origem ambiental, devido à dificuldade de se estabelecer a origem da bactéria presente no leite (ambiente ou glândula mamária), a presença de DNA de *S. agalactiae* em amostras de leite indica com maior confiança a presença de IIM porque a glândula mamária é a principal reservatório do patógeno (HIITIÖ *et al.*, 2015).

Em estudo com 192 amostras de leite de quartos mamários utilizado para comparar a cultura microbiológica com o PCR multiplex em tempo real, a qPCR apresentou sensibilidade de 98,2% (56/57) para identificação de *S. agalactiae* de amostras sabidamente positivas, e de 95,5% para identificação geral de *S. agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *S. aureus* (GILLESPIE E OLIVER, 2005).

O Teste PathoProof Mastitis™ (Thermo Scientific Finnzymes Diagnostic Products and Services, Espoo, Finlândia), possui capacidade para diagnosticar 12 patógenos ou grupos de patógenos mais comuns nos casos de mastite, incluindo *S. agalactiae*. Mahmmoud *et al.* (2013) avaliaram diferentes pontos de corte de Ct do PathoProof comparando com a cultura por meio de análise de classe latente. Foi observado em 53 amostras de leite com *S. agalactiae*, para os pontos de corte de $Ct \leq 39$ e ≤ 32 , sensibilidade de 96,2% e 73,9% para qPCR e de 25,7% e 72,1% para cultura, com especificidade sempre acima de 96%.

Na Noruega, Holmøy *et al.* (2018) analisaram a acurácia do teste Mastitis 4 qPCR com cultura laboratorial por meio de análise de classe latente. As prevalências encontradas foram de 6,4% (N=37) na cultura e de 11,4% (N=66) na qPCR. Os resultados de sensibilidade foram de 58,2% e 95,3% para cultura e qPCR, com especificidade de 99,7% e 98,5%, respectivamente.

2.2.6. Espectrometria de Massa de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo

A espectrometria de massas vem sendo amplamente utilizada por microbiologistas, com resultados rápidos e de baixo custo. Na técnica são extraídas as proteínas ribossomais bacterianas por meio de reagente e uma amostra desse produto é colocada em matriz, que sofre a incidência de laser que vaporiza e ioniza as biomoléculas. Essas são aspiradas por um tubo de vácuo com detector no final e o tempo de voo dos fragmentos gera um gráfico com diversos picos (espectros) que é comparado com os espectros presentes no banco de dados. Assim, só são diagnosticados os microorganismos presentes no referido banco (SINGHAL *et al.*, 2015; NONNEMANN *et al.*, 2019). Na identificação do microrganismo é fornecida um escore (log) de 0 a 3 para cada isolado, no qual: $< 1,7$ = microrganismo não identificado; $\geq 1,7$ a < 2 = identificação em nível de gênero e ≥ 2 = identificação da espécie (NONNEMANN *et al.*, 2019).

Jahan *et al.* (2021) avaliaram a concordância do MALDI-TOF MS com o sequenciamento de gene 16S rDNA, em 481 isolados de amostras de leite. A

concordância para identificação de gênero e espécie foi de 93% e 74% para todos os micro-organismos, e de 96% e 87% para os Gram-positivos (GP), respectivamente. Para *S. agalactiae* os 35 isolados foram identificados corretamente.

Estudo comparou dois tipos de amostras diferentes para MALDI-TOF MS: 1) colônias puras lizadas (método convencional); 2) amostra de leite submetida a pré incubação a 37°C por 12 horas (método teste). Para identificação de *S. agalactiae* os resultados de sensibilidade foram de 96,8% (31/32) para o método convencional e de 21,8% (7/32) para o método teste, concluindo que o método testado não é aplicável (BARREIRO *et al.*, 2018).

Os dados de prevalência e medidas de acurácia de diferentes testes diagnósticos para *S. agalactiae* foram compilados na Tabela 1.

TABELA 1. Acurácia de diferentes testes diagnósticos para identificação de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite de vacas.

Autor/Ano	País	Método	N	Unidade	Prevalência	Sensibilidade	Especificidade
DINSMORE <i>et al.</i> , (1991)	EUA	Cultura	167 vacas	vacas quartos	51,50% .	96,50% 98,80%	100% 100%
GILLESPIE E OLIVER, (2005)	EUA	qPCR	192 quartos	quartos	29,69%	98,20%	.
MAHMMOD <i>et al.</i> , (2013)	Dinamarca	Cultura	614 quartos	quartos	8,60%	72,10%	98,90%
		qPCR Ct ≤ 32			.	73,90%	97,22%
		qPCR Ct ≤ 39			.	96,20%	96,80%
LEELAHAPONGSATHON <i>et al.</i> , (2016)	Tailândia	Cultura	19 vacas	vacas	63,00%	.	.
				quartos	36,00%	.	.
BARREIRO <i>et al.</i> , (2018)	Brasil	MALDI-TOF MS	120 quartos	quartos	26,67%	96,80%	.
COBO-ÁNGEL <i>et al.</i> , (2018)	Colômbia	PCR	1712 vacas	vacas	13,00%	.	.
HOLMØY <i>et al.</i> , (2018)	Noruega	Cultura	578 quartos	quartos	6,40%	58,20%	99,70%
		qPCR			11,40%	95,30%	98,50%
ROSSI <i>et al.</i> , (2018)	Brasil	Cultura	304 vacas	vacas	25,60%	.	.
				quartos	13,00%	.	.
SVENNESEN <i>et al.</i> , (2018)	Dinamarca	Cultura	300 vacas	vacas	7,40%	.	.
		PCR			14,00%		
MESQUITA <i>et al.</i> , (2019)	Brasil	Cultura	306 rebanhos	rebanhos	67,00%	.	.
NONNEMANN <i>et al.</i> , (2019)	Dinamarca	MALDI-TOF MS	34 amostras	amostras	.	100%	100%
CHURAKOV <i>et al.</i> , (2021)	Dinamarca	qPCR	.	rebanhos	8,60%	.	.
JAHAN <i>et al.</i> , (2021)	EUA	MALDI-TOF MS	481 quartos	quartos	7,28%	100%	100%

2.3. Cultura do leite na Fazenda

A cultura na fazenda é uma tecnologia cada vez mais adotada em propriedades leiteiras, indicada para rebanhos com perfil de patógenos contagiosos controlados, uma vez que o intuito é não tratar casos com resultado negativo da cultura ou casos brandos ou moderados por GN, visto que nesses casos a terapia é desnecessária, pois provavelmente ocorrerá cura (LAGO *et al.*, 2011a; VASQUEZ *et al.*, 2017).

A ferramenta consiste na prévia identificação dos casos de MC graus 1 (alterações no leite) e 2 (alterações no leite com sinais de inflamação no úbere) (WENZ *et al.*, 2001) seguida da colheita asséptica de leite do quarto mastítico. Essa amostra é cultivada e o diagnóstico é obtido em até 24 horas. Durante esse tempo a vaca não recebe tratamento, e o receberá apenas se a cultura resultar em GP (VASQUEZ *et al.*, 2017).

Em oito fazendas comerciais nos EUA, Lago *et al.* (2011a, 2011b) randomizaram 499 quartos com MC graus 1 e 2, nos quais metade receberam tratamento convencional imediatamente ao aparecimento do caso e a outra parcela foi tratada após 24 horas, segundo o resultado de cultura. Os casos com resultados negativos e isolados de GN não receberam tratamento com antimicrobianos. A conduta reduziu o uso de antimicrobianos em 50%. Concluíram que o tratamento direcionado com espera de 24 horas não implica prejuízos a curto e longo prazo, incluindo, cura clínica e bacteriológica, risco de mastite e produção de leite.

A princípio o intuito da cultura na fazenda era diferenciar GN dos GP, possibilitando decidir qual caso tratar ou não. Para esse tipo de diagnóstico foi criado pela Universidade de Minnesota, um sistema com placa bipartida contendo um meio para GN (Ágar MacConkey) e outro para GP (Ágar Factor) (MCCARRON *et al.*, 2009).

O diagnóstico entre 18 e 24 horas, comparado ao tempo do envio das amostras e retorno do laudo de laboratório convencional, além da necessidade de mão de obra treinada, mas sem conhecimento de microbiologia, impulsionam o uso da cultura na fazenda para diagnósticos com intuitos além do direcionamento do tratamento.

O interesse em diagnosticar o agente etiológico dos casos de MC na própria fazenda, direciona os sistemas de cultura para métodos que possibilitam a diferenciação dos principais grupos de patógenos, como o sistema Minnesota que criou uma placa tripartida, adicionando um terceiro meio seletivo para estreptococos (Ágar TKT modificado) (MCCARRON *et al.*, 2009).

Mccarron *et al.* (2009) comparam (N=271) a placa Tri-plate do Sistema Minnesota com cultura laboratorial, onde no meio Factor da placa tripartida colônias com beta hemólise são diagnosticadas como *S. aureus*. Foi observada SE e ES de 97,9% e 81,8% para *S. aureus* e de 92,6% e 89,5% para *Streptococcus* spp., respectivamente. Apenas um isolado de *S. aureus* não foi diagnosticado.

2.3.1. Sistemas de cultura na fazenda com meios de cultura cromogênicos

A capacidade de separar os dois principais grupos de bactérias Gram-positivas, tornou-se uma característica desejada presente em outros sistemas. A introdução de placas com meios de cultura cromogênicos possibilitou a identificação em nível de gênero e espécie e, por consequência, tomadas de decisão direcionadas. Porém é válido ressaltar que os métodos laboratoriais não são substituíveis no controle epidemiológico da mastite (FERREIRA *et al.*, 2018).

Os sistemas de cultura na fazenda possuem, em comum, a indicação da semeadura por meio de *swab* estéril, além do processamento de amostras refrigeradas e a incubação entre 18 e 24 horas, o que garante o rápido diagnóstico.

Em estudo com seis fazendas no Brasil, foram cultivadas 504 amostras compostas de leite com MSC, com o intuito de avaliar o meio cromogênico Mastitis GP da CHROMagar. Neste meio, colônias de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* apresentam tom azul turquesa e *S. uberis* e *Enterococcus* spp. azul metálico. Os resultados de SE e ES para *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* (n 46) foram de 89,1% e 96,3%, enquanto para *S. uberis* e *Enterococcus* spp. (n 63) foram de 90,5% e 92,5%, respectivamente (GARCIA *et al.*, 2021).

No Brasil, estudo analisou 1.181 amostras de MC e MSC na placa bipartida da CHROMagar com os meios Mastitis GP e Mastitis GN, na qual foi observado para isolados de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* SE e ES de 71% e 97% para amostras de MC (N=51) e de 89% e 99% para amostras de MSC (N=15) (GRANJA *et al.*, 2021).

OnFarm é um sistema brasileiro de cultura na fazenda com meios cromogênicos. Entre seus produtos possui uma placa (Smartcolor2) com meios seletivos para estafilococos, estreptococos e GN. Granja *et al.* (2021) processaram 976 amostras de leite na placa Smartcolor2 e isolaram *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* de 48 amostras de MC e 50 de MSC. Os resultados revelaram SE de 87% para amostras de MC e de 100% para amostras de MSC, enquanto as ES foram de 94% e 92%, respectivamente. Os dois

agentes supracitados não são diferenciáveis, pois ambos apresentam colônias de tonalidade azul claro/turquesa.

Estudos supracitados (GARCIA *et al.*, 2021; GRANJA *et al.*, 2021) utilizaram MALDI-TOF MS como padrão ouro no diagnóstico em nível de espécie, confirmando a validade desta técnica para diagnosticar patógenos da mastite.

2.3.2. Sistema Accumast de Cultura na Fazenda

A placa de cultura na fazenda Accumast™ (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY) é utilizada em vários países. Possui três seções, com meios de cultura cromogênicos seletivos para estafilococos, estreptococos e GN.

O diagnóstico é observado pela coloração das colônias e o meio de isolados (Figura 1). Exemplo: o diagnóstico dos estreptococos se dá no meio seletivo para tal, onde colônias: azul claro = *S. dysgalactiae*; azul médio = *S. agalactiae*; azul escuro = *S. uberis*, cinza = *Aerococcus viridans*, rosa = *Enterococcus* spp. e lilás ou branco = *Lactococcus* spp. (FERA DIAGNOSTICS AND BIOLOGICALS, 2020). Porém segundo Ganda *et al.* (2016), existe tendência de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* apresentarem colônias em tom de azul claro, não sendo possível diferencia-los.

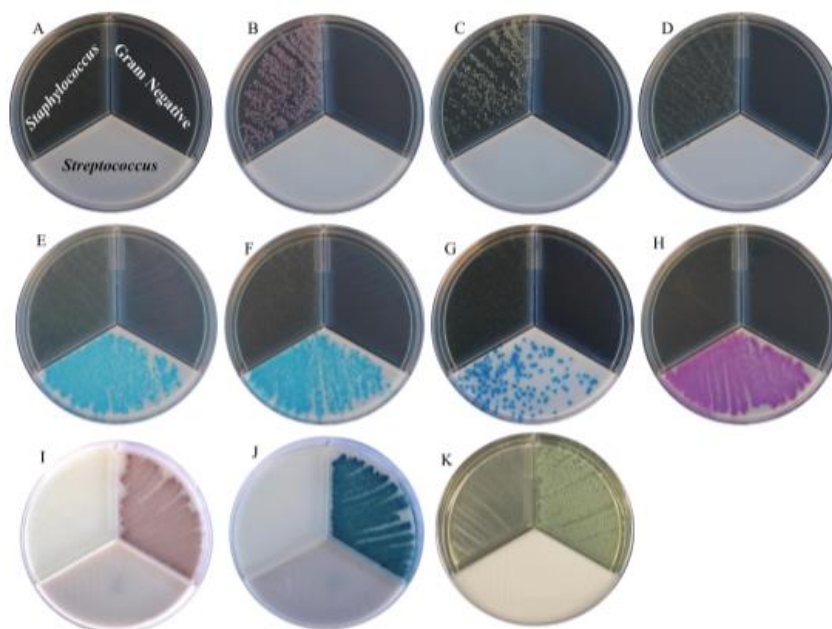


FIGURA 1. Colônias em placa Accumast™ (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY). A) Placa sem crescimento bacteriano; B) *Staphylococcus aureus*, C) *Staphylococcus epidermidis*; D) *Staphylococcus chromogenes*; E) *Streptococcus agalactiae*; F) *Streptococcus dysgalactiae*; G) *Streptococcus uberis*; H) *Enterococcus faecalis*; I)

Escherichia coli; J) *Klebsiella oxytoca* e K) *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Ganda et al., (2016).

Segundo o fabricante, é possível que pessoas com treinamento básico de semeadura, interpretação e noções de contaminação realizem o cultivo na própria fazenda. As amostras são semeadas com *swab* estéril e incubadas a 37°C por 24 horas. Para patógenos contagiosos (*S. agalactiae* e *S. aureus*) com isolamento ≥ 1 colônia o resultado é considerado positivo.

Nos EUA, Ganda *et al.* (2016) avaliaram a placa Accumast em 583 amostras de leite de MC de uma fazenda em Nova Iorque. As amostras foram submetidas a cultura laboratorial padrão (padrão ouro) e cultura na placa Accumast (teste). As colônias isoladas nos meios cromogênico foram identificadas por sequenciamento de 16S rRNA, tendo assim segundo padrão ouro. Os resultados para *Streptococcus* spp. (N=249) foram: SE = 90%, ES = 92,9%, VPP = 91,8% e VPN = 91,2%. Ao comparar o diagnóstico da Accumast com o sequenciamento, a concordância foi alta com coeficiente kappa de 91% e VPP de 95%.

Ferreira *et al.* (2018) avaliaram (N=211) a placa Accumast, Minnesota Tri-plate, Mastitis Quadri plate SSGN e SSGNC, todas com capacidade de diagnosticar *Streptococcus* spp. O padrão ouro utilizado foi concordância de dois laboratórios com confirmação por MALDI-TOF MS. Para os 20 isolados de *Streptococcus* spp., foram observadas SE e ES de 100% e 93,2% para a placa Accumast; 72,7% e 91,5% para Minnesota; 63,6% e 94,2% para SSGN; 63,6% e 91,7% para SSGNC, concluindo que o sistema Accumast apresentou melhor acurácia quando comparado aos outros.

Estudo com 280 amostras de quartos e 60 amostras compostas, avaliou o sistema Accumast e Minnesota Bi-plate e Tri-plate, usando MALDI-TOF como padrão ouro. As prevalências dos estreptococos encontrados foram de 8,5% (N=29) para *S. dysgalactiae*, 5,3% (N=18) para *S. uberis* e 1,2% (N=4) para *S. agalactiae*. Para *Streptococcus* spp. a SE foi de 77% para Accumast e 67% para Tri-plate (SIPKA *et al.*, 2021).

Sipka *et al.* (2021) compararam o diagnóstico de um leitor microbiologista de leite com alunos de veterinária sem conhecimento prévio de microbiologia, apenas com as instruções dos fabricantes. De forma aleatória, a leitura de apenas um observador não experiente foi utilizada para cada amostra, mimetizando a alternância de leitores dentro da propriedade. A concordância entre leitor experiente e não experiente para *Streptococcus* spp. foi de 64% e 37% na Tri-plate e de 61% e 29% na Accumast,

respectivamente, mostrando o quanto o conhecimento de microbiologia interfere na interpretação.

Na tabela 2 são apresentados resultados de Prevalência, SE e ES dos sistemas de cultura na fazenda na identificação de *Streptococcus* spp.

TABELA 2. Prevalência e acurácia diagnóstica de diferentes sistemas de cultura de leite na fazenda para diagnóstico de *Streptococcus* spp.

Autor/Ano	Sistema	N	Prevalência	Sensibilidade	Especificidade
MCCARRON <i>et al.</i> , 2009	Minnesota Tri-plate	271	30,70%	93%	90%
GANDA <i>et al.</i> , 2016	Accumast	538	46,28%	90%	93%
FERREIRA <i>et al.</i> , 2018	Accumast	211	9,48%	100%	93%
FERREIRA <i>et al.</i> , 2018	Minnesota Tri-plate	211	9,48%	73%	92%
FERREIRA <i>et al.</i> , 2018	Quadri plate SSGN	211	9,48%	64%	94%
FERREIRA <i>et al.</i> , 2018	Quadri plate SSGNC	211	9,48%	64%	92%
GARCIA <i>et al.</i> , 2021	CHROMagar	504	9,13%	89%	96%
GRANJA <i>et al.</i> , 2021	CHROMagar	1181	5,58%	89%	99%
GRANJA <i>et al.</i> , 2021	OnFarm	976	10,04%	100%	92%
SIPKA <i>et al.</i> , 2021	Accumast	340	27,40%	77%	.
SIPKA <i>et al.</i> , 2021	Minnesota Tri-plate	340	27,40%	67%	.

1 **CAPÍTULO 2 – Trabalho científico**

2

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

4 (Normas de publicação – ANEXO I)

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Diagnostic accuracy of a chromogenic medium for detection of subclinical mastitis**
27 **caused by *Streptococcus agalactiae***

28

29 Fausto R. Fonseca*, Lara C. B. Juliano*, Miriam A. Pereira⁺, José C. F. Pantoja*¹

30 * Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, College of
31 Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP),
32 Botucatu, São Paulo, Brazil.

33 ⁺ Vale do Rio Verde University, Três Corações, Minas Gerais, Brazil.

34

35 ¹Correspondência autor: jose.pantoja@unesp.br

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50 ABSTRACT

51

52 The objective of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of the
53 Accumast Plus™ chromogenic medium (FERA Diagnostics and Biologicals, College
54 Station, USA) for identification of subclinical mastitis caused by *Streptococcus*
55 *agalactiae* in quarter and composite milk samples. Five herds located in Minas Gerais
56 state, Brazil, were visited once to collect milk from all mammary quarters (N=467) from
57 all lactating cows (N=118). Quarter samples were cultured simultaneously on Accumast
58 Plus™ (index test) and blood agar, from which Gram-positive, catalase-negative cocci
59 isolates were subjected to identification by MALDI-TOF (gold standard). Composite
60 milk samples were prepared in the laboratory and cultured on Accumast Plus™. To
61 analyze the diagnostic accuracy, two cut-off points were adopted: I) isolation of ≥ 1
62 blue colony (definition recommended by the manufacturer) and II) isolation of ≥ 1 blue,
63 white or purple colony. The prevalence of *S. agalactiae* in quarter samples was 18.44%
64 (83/450). The agreement between observers was almost perfect for diagnosis of *S.*
65 *agalactiae* (yes or no; Kappa = 0.97) and identification of colony colors (Kappa = 0.95).
66 The accuracy of the Accumast Plus™ medium (cut-off point I) for quarter milk samples
67 was: sensitivity (SE) = 60.02%, specificity (SP) = 97.97%, positive predictive value
68 (PPV) = 85.88% and negative predictive value (NPV) = 92.04%. At the cut-off point II,
69 the parameters were: SE = 73.50%, SP = 97.97%, PPV = 87.89% and NPV = 93.83%.
70 The accuracy of composite samples was similar to that of quarter milk samples. The
71 observed SE for both quarter and composite samples resulted in high probability of
72 false-negative results (20.00 – 39.98%), which could contribute to maintaining the
73 pathogen within the herd and decreasing the effectiveness of eradication programs.

74

75 **Keywords:** bovine mastitis, on-farm culture, Accumast Plus™, streptococci

INTRODUCTION

Streptococcus agalactiae is an important contagious mastitis pathogen, still prevalent in some regions of the world. In Brazil, Rossi et al. (2018) evaluated 304 cows from positive herds in Minas Gerais and São Paulo states and isolated the pathogen from 25.6% of the cows and 13% of the mammary quarters sampled. Also in Brazil, Mesquita et al. (2019) isolated *S. agalactiae* from 67% of bulk tank milk samples from 306 herds in southern Minas Gerais. *S. agalactiae* is a re-emerging problem in countries such as Denmark (Churakov et al., 2021) and Norway (Holmøy et al., 2019).

Mastitis by *S. agalactiae* results in increased somatic cell count (SCC) (45,000 to 849,000 cells/mL after infection; Ma et al., 2000), decreased milk production (1.24 kg/day within two to three months after infection; Holmøy et al., 2019) and decreased sensory and nutritional quality of pasteurized milk (Ma et al., 2000).

Blitz therapy is an economically viable strategy (Yamagata et al., 1987) that enables the eradication of *S. agalactiae* by means of simultaneous diagnosis and treatment of infected animals (Keefe, 1997). Bacteriological cure rates have been reported between 85.9% and 98% after intramammary treatment with beta-lactam antimicrobials (Rossi et al., 2019). In such eradication programs, it is essential to use diagnostic tests with high sensitivity (SE), which minimize the probability of false-negative results (FN) and, thus, prevent the spread of *S. agalactiae* within the herd.

Milk culturing has been the standard test for diagnosing *S. agalactiae*, with reported SE and specificity (SP) of 98.8% and 100% in quarter milk samples and 96.5% and 100% in composite (mixture of milk from all quarters) milk samples, respectively (Dinsmore et al., 1991). However, the time interval between sample collection, shipping

101 to a laboratory, and access to results (around eight days) can be a problem due to a
 102 longer permanence of reservoirs in the herd.

103 Therefore, adoption of rapid and accurate methods, such as on-farm milk
 104 culturing on chromogenic media (Ferreira et al., 2018), could reduce the diagnosis time
 105 (18-24 hours) and increase the effectiveness of eradication programs. Culturing on
 106 Accumast™ chromogenic medium (FERA Diagnostics and Biologicals, College
 107 Station, USA) resulted in SE and SP of 90% and 92.9%, respectively, for diagnosis of
 108 *Streptococcus* spp. Nonetheless, colonies of *S. agalactiae* and *Streptococcus*
 109 *dysgalactiae* could not be distinguished by color (Ganda et al., 2016).

110 The Accumast Plus™ chromogenic medium (FERA Diagnostics and Biologicals,
 111 College Station, USA) has been recently launched in the market and contains selective
 112 chromogenic medium for on-farm diagnosis of *S. agalactiae*. Scientific evidence needs
 113 to be produced to validate the method, which has the potential to provide rapid and
 114 accurate diagnosis of the agent, thus contributing to the efficiency of eradication
 115 programs.

116 Thus, the objectives of this study were: 1) to evaluate the diagnostic accuracy of
 117 Accumast Plus™ for identification of subclinical mastitis caused by *S. agalactiae*; 2) to
 118 compare the accuracy of the medium between quarter and composite milk samples, and
 119 3) to evaluate the agreement between two observers to read the Accumast Plus™
 120 results.

121

122 MATERIALS AND METHODS

123

124 The present study was approved by the UNESP's Ethics Committee for Animal
 125 Use (protocol 0101/2021). We conducted an observational, cross-sectional study, which

126 was reported according to the STARD guidelines (Bossuyt et al., 2015) for diagnostic
127 accuracy studies.

128

129 ***Inclusion criteria for farms and animals***

130 A convenience sample of five dairy farms (farms A, B, C, D, and E) located in
131 Três Corações, Minas Gerais, Brazil, was used for the study. The herds had to have a
132 history of mastitis by *S. agalactiae* and be located up to 50 km from the research
133 laboratory, to allow processing of refrigerated milk samples. The farms had to have
134 mechanical milking systems, individual identification of cows, and zootechnical data, in
135 addition to voluntary cooperation with the proposed study procedures.

136 Cows were milked in flat barns with bucket milking systems (N=4) or pit parlors
137 with a herringbone system (N=1). The animals were kept in semi-confinement (N=3),
138 pasture (N=1) or compost barn (N=1). The median number of lactating cows was 24
139 (Q1=19 - Q3=33), which produced a total of 280 L/day (Q1=120 - Q3=450), with a
140 median bulk tank milk SCC of 633,000 cells/mL (Q1=530,000 - Q3= 813,000).

141 Cows were eligible for inclusion if they were apparently healthy, had ≥ 3
142 functional mammary quarters, had no visible teat lesions, and had not received any
143 antimicrobial treatment within 14 days before inclusion.

144 A total of 125 cows were presented for possible inclusion in the study, of which
145 seven were excluded because they had been treated with antimicrobials within 14 days.
146 Thus, 118 cows were included, of which 52.5%, 46.6% and 0.85% were cross-bred
147 (between Gir and Holstein), Holstein, and Jersey, respectively. The median parity of the
148 cows was 3 lactations (Q1=2 - Q3=4), which were in 153 days in milk (Q1=90 -
149 Q3=244) and produced 12 kg/cow/day (Q1=8 - Q3 =21).

150

151 ***Sampling strategy***

152 Each farm was visited once to carry out the sampling procedures, between the
153 months of August and December 2021. Except for Farm E, aseptic milk samples were
154 collected during milking from all mammary quarters of all cows included in the study.
155 Farm E had 215 lactating cows, of which 32 were randomly included in the study, to
156 complete the total number of animals required for the study.

157 Samples were collected after the milking technicians performed the udder
158 hygiene procedures (examination of the first milk streams for diagnosis of clinical
159 mastitis (CM), pre-dipping, and drying of teats). Fifteen mL of milk were collected in
160 sterile tubes after performing antisepsis of the teat ends with a cotton pad soaked with
161 70% alcohol. After collection, the samples were refrigerated in a cooler with ice and
162 transported to the laboratory within two hours from the end of milking.

163 General farm information and zootechnical data such as parity, breed, daily milk
164 production, and days in milk were recorded in field forms.

165

166 ***Index test: culture on Accumast PlusTM***

167 Milk cultures were performed in the Universidade Vale do Rio Verde's
168 microbiology laboratory in Três Corações, MG, due to its proximity to the study farms.
169 This strategy allowed the processing of fresh and refrigerated samples, simulating on-
170 farm conditions.

171 Each quarter milk sample was simultaneously cultured on both Accumast PlusTM
172 (index test) and blood agar plates (Hogan et al., 1999) (gold standard). The samples
173 were inoculated onto the Accumast PlusTM's specific quadrant for isolation of *S.*
174 *agalactiae* (Figure 1). Following the manufacturer's instructions, each quadrant was

175 divided in half, allowing two samples to be inoculated on each plate. Plating was
176 performed with a sterile swab, after which plates were incubated at 36°C for 18 hours.

177 Plate readings were recorded using specific forms, including colony size,
178 number and color. According to the manufacturer's instructions, the colony color was
179 used to define the following diagnoses: blue = *S. agalactiae*, pink = *Enterococcus* spp.
180 and lilac = *Lactococcus* spp. (Figure 1). Colonies that presented different colors from
181 those mentioned above were diagnosed as “unidentified”. Additionally, photographs of
182 all plates were recorded.

183 To analyze the diagnostic accuracy of Accumast Plus™ to identify *S. agalactiae*,
184 two cut-off points were adopted: I) isolation of ≥ 1 blue colony (manufacturer's
185 definition), and II) isolation of ≥ 1 blue, white, or purple colony. The latter cut-off point
186 was used in an attempt to increase the SE of the medium.

187 In addition to the quarter samples, composite milk samples were prepared in the
188 laboratory while the milk was still refrigerated. One mL of a cow's each quarter milk
189 sample was transferred into a sterile tube with an automatic pipetter. After
190 homogenization, the composite samples were plated on Accumast Plus™ following the
191 methods described for quarter milk samples.

192

193 ***Gold Standard: culture on blood agar and identification by MALDI-TOF MS***

194 Quarter milk samples were plated onto quadrants of blood agar plates. Plating
195 was performed with a sterile swab, after which plates were incubated at 36°C for 24
196 (first reading) and 48 hours (final reading). After the first 24 hours, the plates were read
197 and results were recorded in a spreadsheet, including the number of colonies, color,
198 size, hemolysis pattern, catalase test, Gram staining results, and morphology. After 48

199 hours of incubation the plates were reassessed to search for additional growth. All plates
200 were photographed.

201 The diagnosis was performed following the National Mastitis Council's
202 guidelines (Hogan et al., 1999). An intramammary infection was defined as the isolation
203 of ≥ 3 similar colonies on the plate. Samples were considered contaminated when there
204 were ≥ 3 different colony types on the plate.

205 All isolates characterized as Gram-positive and catalase-negative cocci were
206 replated on blood agar (24 hours at 36° C) for further identification. These isolates were
207 transported by the researchers to the QualiLeite laboratory (University of São Paulo,
208 Pirassununga, SP), for identification by MALDI-TOF MS, according to Barcelos et al.
209 (2019).

210 The readings of all plates (Accumast Plus™ and blood agar) were performed by
211 two authors (L.C.B.J. and F.R.F), who were masked to each other's results.

212

213 ***Statistical analysis***

214 Data were stored in a Microsoft Excel spreadsheet. The completeness of the
215 dataset was analyzed, and 20 missing data were observed, due to the following
216 reasons: 1) atrophied mammary quarters, N=5; 2) contaminated samples, N=10; 3)
217 unidentified by MALDI-TOF MS, N=4; 4) missing sample, N=3. Descriptive statistics
218 (PROC FREQ and PROC MEANS, SAS Institute, Cary, NC, USA SAS Institute SAS
219 Institute) were produced to present the characteristics of the farms and cows included in
220 the study, as well as the distribution of microbiological results.

221 Sensitivity, SP, positive predictive value (PPV), and negative predictive value
222 (NPV) of Accumast Plus™ to identify *S. agalactiae* were estimated using logistic
223 regression models (PROC GENMOD, SAS Institute) for quarter and composite milk

224 samples, considering MALDI-TOF as the reference method. At the quarter level, a
 225 compound symmetry covariance structure was included in the models to account for the
 226 clustering of quarters within cows.

227 The Kappa coefficient (PROC FREQ, SAS Institute) was used to estimate the
 228 agreement between the readers to diagnose *S. agalactiae* (yes or no), and to determine
 229 the colony colors. Contingency tables (PROC FREQ, SAS Institute) were produced to
 230 present the distribution of colony colors on Accumast Plus™ within both categories of
 231 MALDI-TOF results (negative and positive for *S. agalactiae*).

232 The sample size was calculated to estimate the SE and SP of Accumast Plus™
 233 against the gold standard (Hajian-Tilaki, 2014). The following assumptions were made
 234 for the calculations: expected SE and SP of Accumast Plus™ ≥ 0.90 ; margin of error $\leq$
 235 0.07 and prevalence of *S. agalactiae* infected quarters in the herds = 0.15. Thus, 472
 236 mammary quarters (118 cows) from *S. agalactiae* positive herds were required for the
 237 study.

238

239 RESULTS

240

241 ***Prevalence of Streptococcus agalactiae***

242 A total of 118 cows and 467 quarters were included in the study. The quarter
 243 level prevalence (based on the gold standard) of *S. agalactiae* was 18.44% (83/450).
 244 The apparent prevalences based on the Accumast Plus™ cut-off points 1 and 2 were
 245 13.06% (61/467) and 14.99% (70/467), respectively.

246 Of the 102 samples characterized as Gram-positive and catalase-negative cocci,
 247 95 were submitted to identification by MALDI-TOF MS, of which 83 (87.37%) were
 248 diagnosed as *S. agalactiae* (Table 1).

249

250 ***Accuracy of Accumast Plus™***

251 The accuracy parameters of Accumast Plus™ for diagnosing *S. agalactiae* are
 252 presented in Tables 2 and 3. For quarter milk samples, the SE varied between 60.02%
 253 (cut-off point I) and 73.50% (cut-off point II), resulting in 39.98% and 26.50% of FN
 254 results, respectively. Especificity was high for both cut-off points, resulting in 2.03% of
 255 false-positive results (FP) (Table 2).

256 At the prevalence level observed in the study, 92.04% (cut-off point I) and
 257 93.83% (cut-off point II) of the Accumast Plus™ negative cultures corresponded to
 258 mammary quarters that were uninfected with *S. agalactiae* (Table 2).

259 The use of composite samples resulted in similar SE and SP to those observed
 260 for quarter samples. However, in relation to quarter samples, there was a loss of 8.45
 261 and 3.24 percentage points in NPV at cut-off points I and II, respectively (Table 2).

262 Unlike SP, SE varied substantially (4.72% to 88.05%) among the study herds
 263 (Table 4).

264 The Kappa coefficient was 0.97 (95% confidence interval [CI] = 0.93-1.00) and
 265 0.95 (95% CI = 0.91-0.99) for the diagnosis of *S. agalactiae* (yes or no) or color
 266 identification, respectively, indicating high agreement between the two readers.

267

268 ***Distribution of colony colors on Accumast Plus™***

269 Of the 83 isolates from quarter milk samples that were confirmed as *S.*
 270 *agalactiae* by MALDI-TOF MS, 65.06% and 9.64% corresponded to growth of blue
 271 and white colonies on Accumast Plus™, respectively. However, 25.30% of the positive
 272 samples corresponded to no growth on Accumast Plus™ (Table 5). Similar patterns of
 273 color distribution were observed using composite milk samples, except for four *S.*

274 *agalactiae* positive samples that corresponded to growth of lilac colonies on Accumast
275 Plus™ (Table 5).

276

277 DISCUSSION

278

279 The aim of this study was not to validate the Accumast Plus™ chromogenic
280 medium itself, but to assess its accuracy in diagnosing *S. agalactiae* subclinical mastitis
281 in field conditions. We aimed to simulate on-farm culturing, in which refrigerated milk
282 is plated onto chromogenic media using a sterile cotton swab. Milk culturing on blood
283 agar was not performed on the farms due to the inadequate environment and consequent
284 risk of contamination. Thus, culturing on both Accumast Plus™ and blood agar was
285 performed simultaneously in the laboratory, a few hours after sample collection.

286 The reading of Accumast Plus™ was easy to perform, as evidenced by the
287 almost perfect agreement observed between the readers (Landis and Koch; 1977), for
288 both the presence or absence of *S. agalactiae* on the plates, and the interpretation of
289 colony colors. Nonetheless, it should be noted that both researchers had extensive
290 experience in mastitis microbiological diagnosis and extrapolation of these results must
291 be done with care to untrained personnel.

292 Due to the high cost of the plate in the Brazilian market, each quadrant of the
293 Accumast Plus™ was divided into two equal parts (as recommended by the
294 manufacturer), reducing by half the plating surface of the medium. It is possible that
295 this strategy contributed to the low SE of Accumast Plus™, in relation to the gold
296 standard.

297 Cut-off point II was used in our analysis in an attempt to increase the SE of the
298 Accumast Plus™, because we observed growth of white and purple colonies on the

299 chromogenic medium that corresponded to samples that were confirmed as *S.*
300 *agalactiae* by MALDI-TOF MS. Although there was a gain in SE by using cut-off point
301 II (60.02% to 73.50%), the white and lilac colonies observed on the chromogenic
302 medium were not submitted to MALDI-TOF MS to confirm the diagnosis. Due to
303 budget limitations, the study was not designed to subject colonies from Accumast
304 Plus™ to MALDI-TOF MS.

305 The Accumast Plus™ chromogenic medium showed high PPV, since 85.88% of
306 the blue colonies corresponded to MALDI-TOF MS positive samples (PPV). However,
307 the observed SE (60.02% and 73.50%) for quarter milk samples resulted in 39.98% and
308 26.50% of FN results, which is a problem in *S. agalactiae* eradication programs.
309 Infected quarters with FN culture results can be reservoirs of the pathogen and
310 contribute to the occurrence of new infections (Leelahapongsathon et al., 2016).
311 Alternative methods to increase SE, such as increasing the plating area or performing
312 serial cultures, could be considered in future studies to increase the applicability of the
313 system at the farm level.

314 The SE of Accumast Plus™ observed in our study (73.50% at cut-off point II)
315 agrees with a previous study (Sipka et al., 2021), in which the accuracy of the
316 Accumast™ chromogenic medium was 77% for the diagnosis of *Streptococcus* spp.,
317 considering the same gold-standard (culturing on blood agar followed by MALDI-TOF
318 MS). In other studies conducted in the USA, Ganda et al. (2016) and Ferreira et al.
319 (2018) reported SE of 90% and 100%, respectively, for Accumast™, for identification
320 of *Streptococcus* spp., although the system was not able to differentiate *S. agalactiae*
321 from other streptococcal species.

From a financial point of view, the use of composite milk samples is more interesting, due to requiring less labor and being less expensive. However, due to the dilution of milk from infected quarters by milk from healthy quarters, a decrease in SE could be expected to detect *S. agalactiae* (Reyher and Dohoo, 2011). In agreement with a previous study (Rossi et al., 2018), we observed small changes in SE (2.48 and 6.50 percentage points for cut-off points I and II, respectively) between quarter and composite milk samples, which can be explained by the high concentration of *S. agalactiae* observed in milk from infected quarters (Guterbock and Blackmer, 1984).

CONCLUSIONS

The agreement between observers when reading Accumast Plus™ was almost perfect, for both the diagnosis of *S. agalactiae* (yes or no), and for the identification of colony colors.

347 Milk culturing with Accumast Plus™ resulted in high SP to correctly identify
 348 uninfected quarters of cows. The PPV indicates that the isolation of blue colonies
 349 corresponds, with high probability, to the isolation of *S. agalactiae* in quarter or
 350 composite milk samples. For composite samples, there was no significant accuracy loss.

351 However, the observed SE for both quarter and composite milk samples resulted
 352 in a high probability of FN results, which could contribute to maintaining the pathogen
 353 within the herd and decreasing the effectiveness of eradication programs.

354

355 ACKNOWLEDGMENTS

356

357 We thank the farmers and staff for cooperating with the study activities, and
 358 FERA Animal Health LCC for donating the Accumast Plus™ plates used in this study.
 359 FERA Animal Health had no participation in any phase of the present study.

360

361 REFERENCES

362

- 363 Barcelos, M. M., Martins, L., Grenfell, R. C., Juliano, L., Anderson, K. L., Dos Santos,
 364 M. V., Gonçalves, J. L. 2019. Comparison of standard and on-plate extraction
 365 protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF
 366 MS. Brazilian Journal of Microbiology. 50(3):849-857.
- 367 Bossuyt, P. M., Reitsma, J. B., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Glasziou, P. P., Irwig, L.,
 368 Lijmer, J. G., Moher, D., Rennie, D., de Vet, H. C. W., Kressel, H. Y., Rifai, N.,
 369 Golub, R. M., Altman, D. G., Hooft, L., Korevaar, D. A., Cohen, J. F. 2015.
 370 STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic
 371 accuracy studies. BMJ 351:h5527.

- 372 Churakov, M., Katholm, J., Rogers, S., Kao, R. R., Zadoks, R. N. 2021. Assessing
373 potential routes of *Streptococcus agalactiae* transmission between dairy herds
374 using national surveillance, animal movement data and molecular typing. Prev
375 Vet Med. 197:105501.
- 376 Dinsmore, R. P., English, P. B., Gonzalez, R. N., Sears, P. M., Schulte, H. F. 1991.
377 Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*
378 intramammary infections in dairy cattle. J Dairy Sci. 74(5):1521-1526.
- 379 Ferreira, J. C., Gomes, M. S., Bonsaglia, E. C., Canisso, I. F., Garrett, E. F., Stewart, J.
380 L., Zhou, Z., Lima, F. S. 2018. Comparative analysis of four commercial on-
381 farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in
382 dairy cattle. PLoS One. 13(3):e0194211.
- 383 Ganda, E. K., Bisinotto, R. S., Decter, D. H., Bicalho, R. C. 2016. Evaluation of an on-
384 farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens
385 associated with clinical mastitis in dairy cows. PloS One. 11(5):e0155314.
- 386 Guterbock, W. M., Blackmer, P. E. 1984. Veterinary interpretation of bulk-tank milk
387 [Cow California Mastitis Tests, somatic cell counts]. The veterinary clinics of
388 North America.
- 389 Hajian-Tilaki, K. 2014. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical
390 informatics. Journal of biomedical informatics. 48:193-204.
- 391 Hogan, J. S., Gonzalez, R. N., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J.
392 W., Smith, K. L. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. National
393 Mastitis Council. Inc., Madison, WI. 78(7):485-488.
- 394 Holmøy, I. H., Toftaker, I., Kirkeby, C., Østerås, O., Jørgensen, H. J., Nødtvedt, A.
395 2019. A cohort study of the effect of *Streptococcus agalactiae* on milk yield and
396 somatic cell count in Norwegian dairy cows. J Dairy Sci. 102(9):8385-8399.

- 397 Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. The Canadian
398 veterinary journal. 38(7):429.
- 399 Landis, J. R., Koch, G. G. 1977. The measurement of observer agreement for
400 categorical data. Biometrics. 159-174.
- 401 Leelahapongsathon, K., Schukken, Y. H., Pinyopummintr, T., Suriyasathaporn, W.
402 2016. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and
403 *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. J Dairy Sci. 99(2):1418-
404 1426.
- 405 Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D. M., Galton, D. M., Rudan, M. A., Boor, K. J. 2000.
406 Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J
407 Dairy Sci. 83(2):264-274.
- 408 Mesquita, A. A., Rocha, C. M., Bruhn, F. R., Custódio, D. A., Braz, M. S., Pinto, S. M.,
409 Silva, D. B., Costa, G. M. 2019. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus*
410 *agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with
411 the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. Pesquisa
412 Veterinária Brasileira. 39:308-316.
- 413 Reyher, K. K., Dohoo, I. R. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of
414 composite milk samples to detect intramammary infections. J Dairy
415 Sci. 94(7):3387-3396.
- 416 Rossi, R. S., Amarante, A. F., Correia, L. B. N., Guerra, S. T., Nobrega, D. B.,
417 Latosinski, G. S., Rossi, B. F., Rall, V. L. M. Pantoja, J. C. F. 2018. Diagnostic
418 accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological
419 examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae*
420 intramammary infections. J Dairy Sci. 101(11):10220-10229.

- 421 Rossi, R. S., Amarante, A. F., Guerra, S. T., Latosinski, G. S., Rossi, B. F., Rall, V. L.
422 M., Pantoja, J. C. F. 2019. Efficacy of cefquinome and a combination of
423 cloxacillin and ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus*
424 *agalactiae* subclinical mastitis. PLoS One. 14(4):e0216091.
- 425 Sipka, A., Wieland, M., Biscarini, F., Rossi, R. M., Roman, N., Santisteban, C., Moroni,
426 P., Nydam, D. V. 2021. Comparative performance of 3 on-farm culture systems
427 for detection of mastitis pathogens interpreted by trained and untrained
428 observers. J Dairy Sci. 104(4):4936-4941.
- 429 Yamagata, M., Goodger, W. J., Weaver, L., Franti, C. 1987. The economic benefit of
430 treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in Lactating cows. Food
431 Animal Economics. 191(12):1556-1560.
- 432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445

Table 1. Microbiological results of milk samples cultured on the Accumast Plus™ plate, blood agar, and isolates subjected to MALDI-TOF MS identification.

Microbiological Results	Blood Agar		MALDI-TOF MS		Accumast Plus™	
	N	%	N	%	N	%
Negative	195	42,67			321	68,74
Gram+ catalase- Cocci ¹	102	22,32				
<i>Streptococcus agalactiae</i>			83	87,37	61	13,06
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>			2	2,11	16	3,42
<i>Streptococcus uberis</i>			3	3,16	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>			2	2,11	12	2,57
<i>Enterococcus faecium</i>			1	1,05	0	0
<i>Streptococcus canis</i>			1	1,05		
<i>Streptococcus pluranimalium</i>			1	1,05		
<i>Proteus mirabilis</i>			1	1,05		
<i>Brevibacillus agri</i>			1	1,05		
Other pathogens	160	35,01			57	12,21
Total	457	100	95	100	467	100

¹ Gram-positive and catalase-negative cocci.

Table 2. Diagnostic accuracy parameters (%) (95% confidence intervals) of milk culturing on the Accumast Plus™ plate for detection of *S. agalactiae* from quarter and composite milk samples.

	Quarter samples		Composite samples	
	cut-off point I ¹	cut-off point II ²	cut-off point I ¹	cut-off point II ²
N ³	450	450	118	118
Sensitivity	60.02 (46.22 – 73.39)	73.50 (60.73 – 83.26)	62.50 (46.77 – 75.97)	80.00 (64.83 – 89.67)
Specificity	97.97 (95.33 – 99.13)	97.97 (95.33 – 99.13)	98.72 (91.46 – 99.82)	98.72 (91.46 – 99.82)
False-negative	39.98 (26.61 – 53.78)	26.50 (16.74 – 39.27)	37.50 (24.03 – 53.23)	20.00 (10.33 – 35.17)
False-positive	2.03 (0.87 – 4.67)	2.03 (0.87 – 4.67)	1.28 (0.18 – 8.54)	1.28 (0.18 – 8.54)
PPV ⁴	85.88 (71.51 – 93.65)	87.89 (75.24 – 94.55)	96.15 (77.21 – 99.46)	96.97 (81.39 – 99.58)
NPV ⁵	92.04 (87.44 – 95.06)	93.83 (89.66 – 96.39)	83.69 (74.69 – 89.93)	90.59 (82.30 – 95.22)

¹ Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue colony.

² Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue, white or lilac colony.

³ Total number of samples.

⁴ Positive Predictive Value.

⁵ Negative Predictive Value.

Table 3. Contingency tables used to calculate the diagnostic accuracy parameters for milk culturing on the Accumast Plus™ plate for the detection of *Streptococcus agalactiae* from quarter and composite milk samples.

Accumast Plus™	MALDI-TOF MS		
	Positive	Negative	Total
Quarter - cut-off point I ¹			
Positive	54	7	61
Negative	29	360	389
Total	83	367	450
Quarter - cut-off point II ²			
Positive	62	7	69
Negative	21	360	381
Total	83	367	450
Composite - cut-off point I ¹			
Positive	25	1	26
Negative	15	77	92
Total	40	78	118
Composite - cut-off point II ²			
Positive	32	1	33
Negative	8	77	85
Total	40	78	118

¹ Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue colony.

² Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue, white or lilac colony.

Table 4. Prevalence and sensitivity of milk culturing on the Accumast Plus™ plate for detection of *Streptococcus agalactiae* from quarter and composite milk samples, by farm.

Farm	Prevalence	cut-off point II ²	cut-off point II ²
		SE ³	SE ³
A	8.97% (7/78)	84.33 (38.51 – 97.88)	84.43 (38.67 – 97.90)
B	51.52% (34/66)	88.05 (63.74 – 96.86)	87.88 (63.40 – 96.81)
C	5.97% (4/67)	75.00 (-)	75.00 (-)
D	19.51% (24/123)	59.33 (31.61 – 82.15)	69.68 (42.62 – 87.67)
E	12.07% (14/116)	4.72 (0.76 – 24.21)	46.03 (23.40 – 70.43)

¹Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue colony.

² Diagnosis of *S. agalactiae* by the presence of ≥ 1 blue, white or lilac colony.

³ Sensitivity.

Table 5. Association between the colony colors observed on the Accumast Plus™ plate and the results of the gold standard method (MALDI-TOF MS), by quarter and composite milk samples.

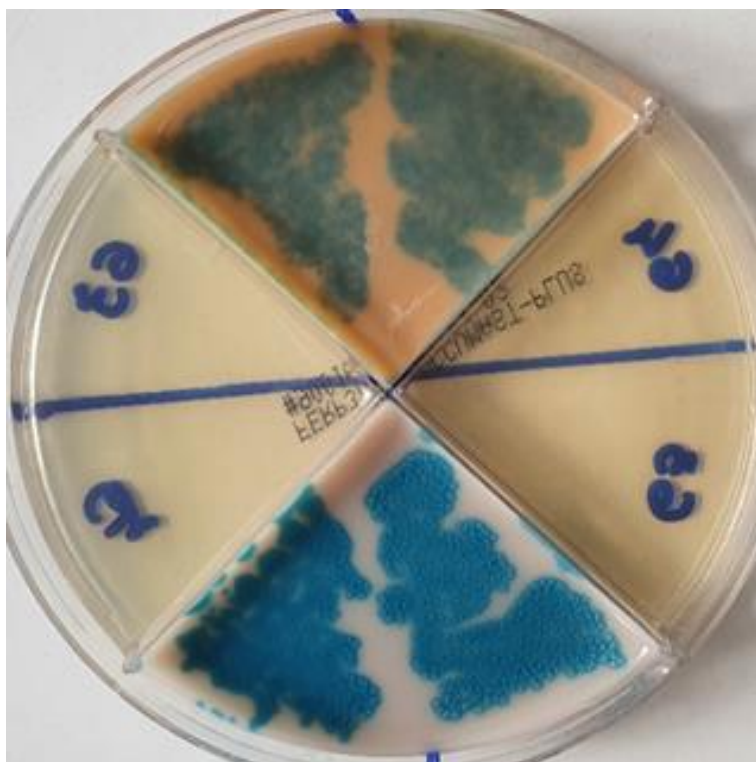
Accumast Plus™ colony color	Quarter mammary sample			Composite sample		
	MALDI-TOF+ ¹	MALDI-TOF- ²	Total	MALDI-TOF+	MALDI-TOF-	Total
Blue	54 (65,06%) ³	7 (1,91%)	61	25 (62,50%)	1 (1,28%)	26
White	8 (9,64%)	0	8	3 (7,50%)	0	3
Lilac	0	0	0	4 (10,00%)	0	4
Negative	21 (25,30%)	360 (98,09%)	381	8 (20,00%)	77 (98,72%)	85
Total	83	367	450	40	78	118

¹ Isolates diagnosed by MALDI-TOF MS as positive for *S. agalactiae*.

² Isolates diagnosed by MALDI-TOF MS as negative for *S. agalactiae*.

³ Percentage of column total.

536 **Fonseca, Figure 1.**



537

538 **Figure 1.** Accumast Plus™ plate (FERA Diagnostics and Biologicals, College Station,
539 USA). Growth of blue colonies the selective medium for isolation of *Streptococcus*
540 *agalactiae* (upper quadrant) and *Streptococcus* spp (lower quadrant).

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a acurácia do meio Accumast Plus™ para diagnosticar mastite subclínica causada por *S. agalactiae*. O delineamento do estudo visou a simulação da cultura na fazenda, na qual o leite refrigerado é cultivado nas placas com auxílio de um *swab* estéril.

O meio Accumast Plus™ é comercialmente disponível, indicado para cultura na fazenda, sendo aplicável em rebanhos com *S. agalactiae* que queiram erradicar o mesmo. Desta forma o presente estudo tem relevante contribuição para com a pecuária leiteira, uma vez que revela a acurácia diagnóstica do meio, permitindo que usuários da mesma tenham ciência de seus pontos fortes e limitações.

O ponto de corte II foi utilizado em nossa análise com o intuito de aumentar a SE da placa Accumast Plus™, porque observou-se o crescimento de colônias brancas e lilás no meio para *S. agalactiae*, as quais eram correspondentes a amostras positivas para *S. agalactiae* no MALDI-TOF MS.

O meio cromogênico da placa Accumast Plus™ demonstrou alta seletividade para o agente, sendo que 88,52% das colônias características corresponderam a amostras positivas no MALDI-TOF MS (VPP). No entanto, a SE observada (65,06% e 74,70%) em amostras de quarto resultou em 34,94% e 25,30% de resultados FN, o que é um problema em programas de erradicação de *S. agalactiae*. Quartos mamários cujos resultados da cultura foram FN são reservatórios do patógeno e contribuem para a ocorrência de novas infecções.

A SE da placa Accumast Plus™ reportada aqui (74,70% no ponto de corte II) concorda com um estudo prévio (Sipka et al., 2021), no qual a acurácia da placa cromogênica Accumast (diagnostico em nível de gênero) foi reportada em 77% para o diagnóstico de *Streptococcus* spp, considerando um padrão ouro similar (cultura em ágar sangue com diagnósticos confirmados por MALDI-TOF MS). Em outros estudos realizados nos EUA, Ganda et al. (2016) e Ferreira et al. (2018) reportaram SE de 90% e 100%, respectivamente, para a placa Accumast, na identificação de *Streptococcus* spp, embora o sistema não tenha sido capaz de diferenciar *S. agalactiae* de outras espécies de estreptococos.

O cultivo de amostras compostas é mais interessante do ponto de vista financeiro, além de minimizar o trabalho de colheita. No presente estudo observou-se que a SE das duas amostragens foram bem próximas em ambos os pontos de corte, o que pode ser explicada pela alta liberação do patógeno no leite.

CONCLUSÃO GERAL

A cultura do leite na placa Accumast Plus™ resultou em alta ES na identificação de quartos ou vacas não infectadas. Para as amostras compostas, não houve perdas significantes de acurácia. No entanto, a SE observada em amostras de quarto mamário ou compostas resultou em alta probabilidade de resultados FN, o que poderia implicar na disseminação do patógeno e diminuição da eficácia dos programas de erradicação.

REFERÊNCIAS

- BARCELOS, M. M., MARTINS, L., GRENFELL, R. C., JULIANO, L., ANDERSON, K. L., DOS SANTOS, M. V., GONÇALVES, J. L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.50, n.3, p.849-857, 2019.
- BARREIRO, J. R., GONÇALVES, J. L., GRENFELL, R., LEITE, R. F., JULIANO, L., SANTOS, M. V. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.49, p.801-807, 2018.
- BOSSUYT, P. M., REITSMA, J. B., BRUNS, D. E., GATSONIS, C. A., GLASZIOU, P. P., IRWIG, L., LIJMER, J. G., MOHER, D., RENNIE, D., DE VET, H. C. W., KRESSEL, H. Y., RIFAI, N., GOLUB, R. M., ALTMAN, D. G., HOOFT, L., KOREVAAR, D. A., COHEN, J. F. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*, 351:h5527, 2015.
- BUSANELLO, M., ROSSI, R. S., CASSOLI, L. D., PANTOJA, J. C., MACHADO, P. F. 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.
- CHEN, S. L. Genomic insights into the distribution and evolution of group B *streptococcus*. *Frontiers in Microbiology*, v.10, p.1447, 2019.
- CHURAKOV, M., KATHOLM, J., ROGERS, S., KAO, R. R., ZADOKS, R. N. Assessing potential routes of *Streptococcus agalactiae* transmission between dairy herds using national surveillance, animal movement data and molecular typing. *Preventive Veterinary Medicine*, v.197, p.105501, 2021.
- COBO-ÁNGEL, C., JARAMILLO-JARAMILLO, A. S., LASSO-ROJAS, L. M., AGUILAR-MARIN, S. B., SANCHEZ, J., RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C., CEBALLOS-MÁRQUEZ, A., ZADOKS, R. N. *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *PloS One*, v.13, n.12, p.e0208990, 2018.
- DENG, Z., KOOP, G., HOGEVEEN, H., FISCHER, E. A., VAN DEN BORNE, B. H., VAN DER TOL, R., LAM, T. J. Transmission dynamics of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in a Dutch dairy herd using an automatic milking system. *Preventive Veterinary Medicine*, v.192, p.105384, 2021.

DINSMORE, R. P., ENGLISH, P. B., GONZALEZ, R. N., SEARS, P. M., SCHULTE, H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.5, p.1521-1526, 1991.

EDMONDSON, P. Blitz therapy for the eradication of *Streptococcus agalactiae* infections in dairy cattle. *In Practice*, v.33, n.1, p.33-37, 2011.

EDMONDSON, P. W. An economic justification of 'blitz' therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. *The Veterinary Record*, v.125, p.591-593, 1989.

ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *Food Animal Economics*, v.196, n.8, p.1230-1235, 1990.

FERA DIAGNOSTICS AND BIOLOGICALS: AccuMast Guide, 2020. Disponível em: < https://feraah.com/wp-content/uploads/2020/11/AccuMast_Guide_2020_r1.pdf> Acessado em 25 de abr de 2022.

FERREIRA, J. C., GOMES, M. S., BONSAGLIA, E. C., 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.e0194211, 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.e0155314, 2016.

GARCIA, B. L. N., FIDELIS, C. E., FREU, G., GRANJA, B. D. M., DOS SANTOS, M. V. Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.420, 2021.

GILLESPIE, B. E., OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, v.88, n.10, p.3510-3518, 2005.

GRANJA, B. M., FIDELIS, C. E., GARCIA, B. L. N., DOS SANTOS, M. V. Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.104, n.8, p.9115-9129, 2021.

GURJAR, A., GIOIA, G., SCHUKKEN, Y., WELCOME, F., ZADOKS, R., MORONI, P. Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms, *Veterinary clinics: Food animal practice*, v.28, n.3, p.565-576, 2012.

GUTERBOCK, W. M., BLACKMER, P. E. Veterinary interpretation of bulk-tank milk [Cow California Mastitis Tests, somatic cell counts]. *The veterinary clinics of North America*. 1984.

HAJIAN-TILAKI, K. 2014. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *Journal of biomedical informatics*, v.48, p.193-204, 2014.

HIITIÖ, H., RIVA, R., AUTIO, T., POHJANVIRTA, T., HOLOPAINEN, J., PYÖRÄLÄ, S., PELKONEN, S. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *Journal of Dairy Research*, v.82, n.2, p.200-208, 2015.

HOGAN, J. S., GONZALEZ, R. N., HARMON, R. J., NICKERSON, S. C., OLIVER, S. P., PANKEY, J. W., SMITH, K. L. Laboratory handbook on bovine mastitis. *National Mastitis Council. Inc., Madison, WI*, v. 78, n. 7, p. 485-488, 1999.

HOLMØY, I. H., TOFT, N., JØRGENSEN, H. J., MØRK, T., SØLVERØD, L., NØDTVEDT, A. Latent class analysis of real time qPCR and bacteriological culturing for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in cow composite milk samples. *Preventive Veterinary Medicine*, v.154, p.119-123, 2018.

HOLMØY, I. H., TOFTAKER, I., KIRKEBY, C., ØSTERÅS, O., JØRGENSEN, H. J., NØDTVEDT, A. A cohort study of the effect of *Streptococcus agalactiae* on milk yield and somatic cell count in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.9, p.8385-8399, 2019.

JAHAN, N. A., GODDEN, S. M., ROYSTER, E., SCHOENFUSS, T. C., GEBHART, C., TIMMERMAN, J., FINK, R. C. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from bovine milk samples. *Journal of Microbiological Methods*, v.182, p.106168, 2021.

JØRGENSEN, H. J., NORDSTOGA, A. B., SVILAND, S., ZADOKS, R. N., SØLVERØD, L., KVITLE, B., & MØRK, T. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds—rewriting the textbooks?. *Veterinary Microbiology*, v.184, p.64-72, 2016.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, v.38, n.7, p.429, 1997.

KEEFE, G. P. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.28, n.2, p.203-216, 2012.

KRISHNAMOORTHY, P., GOUDAR, A. L., SURESH, K. P., ROY, P. Global and countrywide prevalence of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle and buffaloes by systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, v.136, p.561-586, 2021.

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

LAGO, B., 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.

LANGE, B., KHAN, P., KALMAMBETOVA, G., AL-DARRAJI, H. A., ALLAND, D., ANTONENKA, U., KRANZER, K. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF cycle threshold level to predict smear positivity: a meta-analysis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, v.21, n.5, p.493-502, 2017.

LEELAHAPONGSATHON, K., SCHUKKEN, Y. H., PINYOPUMMINTR, T., SURIYASATHAPORN, W. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, v.99, n.2, p.1418-1426, 2016.

MA, Y., RYAN, C., BARBANO, D. M., GALTON, D. M., RUDAN, M. A., BOOR, K. J. (2000). Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of dairy science*, v.83, n.2, p.264-274, 2000.

MAHMMOD, Y. S., TOFT, N., KATHOLM, J., GRØNBÆK, C., KLAAS, I. C. Estimation of test characteristics of real-time PCR and bacterial culture for diagnosis of subclinical intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy cattle

in 2012 using latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, v.109, n.3-4, p.264-270, 2013.

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, 2009.

MESQUITA, A. A., ROCHA, C. M., BRUHN, F. R., CUSTÓDIO, D. A., BRAZ, M. S., PINTO, S. M., SILVA, D. B., COSTA, G. M. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.39, p.308-316, 2019.

NONNEMANN, B., LYHS, U., SVENNESEN, L., KRISTENSEN, K. A., KLAAS, I. C., PEDERSEN, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, v.102 n.3, p.2515-2524, 2019.

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.

PERRY, J. D., FREYDIERE, A. M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, n.6, p.2046-2055, 2007.

PERRY, J. D., OLIVER, M., NICHOLSON, A., WRIGHT, J., GOULD, F. K. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. *Letters in Applied Microbiology*, v.43, n.6, p.615-618, 2006.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, v.34, n.5, p.565-578, 2003.

REYES, J., CHAFFER, M., SANCHEZ, J., TORRES, G., MACIAS, D., JARAMILLO, M., DUQUE, P. C., CEBALLOS, A. KEEFE, G. P. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. *Journal of Dairy Science*, v.98, 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, 2001.

ROSSI, R. S., AMARANTE, A. F., CORREIA, L. B. N., GUERRA, S. T., NOBREGA, D. B., LATOSINSKI, G. S., ROSSI, B. F., RALL, V. L. M. PANTOJA, J. C. F. Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, v.101, n.11, p.10220-10229, 2018.

ROSSI, R. S., AMARANTE, A. F., GUERRA, S. T., LATOSINSKI, G. S., ROSSI, B. F., RALL, V. L. M., PANTOJA, J. C. F. Efficacy of cefquinome and a combination of cloxacillin and ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis. *Plos One*, v.14, n.4, p.e0216091, 2019.

SALEM, N., ANDERSON, J. J. Evaluation of four chromogenic media for the isolation of group B *Streptococcus* from vaginal specimens in pregnant women. *Pathology*, v.47, n.6, p.580-582, 2015.

SINGHAL, N., KUMAR, M., KANAUIA, P. K., VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.791, 2015.

SIPKA, A., WIELAND, M., BISCARINI, F., ROSSI, R. M., ROMAN, N., SANTISTEBAN, C., MORONI, P., NYDAM, D. V. Comparative performance of 3 on-farm culture systems for detection of mastitis pathogens interpreted by trained and untrained observers. *Journal of Dairy Science*, v.104, n.4, p.4936-4941, 2021.

SØRENSEN, U. B. S., KLAAS, I. C., BOES, J., FARRE, M. The distribution of clones of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) among herdspersons and dairy cows demonstrates lack of host specificity for some lineages. *Veterinary Microbiology*, v.235, p.71-79, 2019.

SVENNESEN, L., NIELSEN, S. S., MAHMMOD, Y. S., KRÖMKER, V., PEDERSEN, K., KLAAS, I. C. Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.1, p.629-639, 2019.

VASQUEZ, A. K., NYDAM, D. V., CAPEL, M. B., EICKER, S., & VIRKLER, P. D. Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 4, p. 2992-3003, 2017.

YAMAGATA, M., GOODGER, W. J., WEAVER, L., FRANTI, C. The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in Lactating cows. *Food Animal Economics*, v.191, n.12, p.1556-1560, 1987.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; DINSMORE, R. P.; CALLAN, R. J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 218, n. 4, p. 567 572, 2001.

ANEXO I – Normas de publicação da revista Journal of Dairy Science

Link:

https://els-jbs-prod-cdn.literatumonline.com/pb/assets/raw/Health%20Advance/journals/jods/JDS_Instruct_for_Contributors_SF-1561399875737.pdf