



CIRCULAR TÉCNICA V2 N11 MPDR

Autores*

Rodrigo Carvalho Bicalho

Tiago Tomazi

Lucas Carvalho Siqueira

Patricia Wolkmer

Chester Patrique Batista

CULTURA MICROBIOLÓGICA NA FAZENDA PARA TRATAMENTO DE MASTITE CLÍNICA REDUZ O USO DE ANTIBIÓTICOS SEM AFETAR OS ÍNDICES PRODUTIVOS

O que é um programa de cultura microbiológica de leite na fazenda (PCF)?

É uma estratégia de manejo utilizada na fazenda, a qual se baseia no uso de técnicas laboratoriais simplificadas para identificar de forma rápida o agente causador da mastite clínica (MC). Com base nos resultados da cultura microbiológica observados entre 16-24 horas após a inoculação da amostra de leite, esta ferramenta diagnóstica permite o uso mais racional de antimicrobianos através do tratamento seletivo dos casos de mastite no rebanho. É importante salientar que é necessário considerar a gravidade dos sinais clínicos apresentados pelo animal acometido (Figura 1) antes de incluí-lo no protocolo de terapia seletiva. Apenas vacas com sinais clínicos leves e moderados devem ser consideradas para cultura microbiológica.

As vacas com sinais clínicos graves devem ser tratadas com antibióticos e receber terapia de suporte (por exemplo, anti-inflamatórios e fluidoterapia) o mais rápido possível para reduzir o risco de septicemia e morte.



Figura 1 – Escores de gravidade da mastite clínica.

Por quê realizar o tratamento seletivo de MC em rebanhos leiteiros?

A resposta para essa pergunta é simples e objetiva: nem todos os casos de mastite clínica necessitam de tratamento com antibióticos. Estudos realizados em fazendas de diversos países, incluindo o Brasil, relataram que entre 35 e 50% das amostras de leite coletadas no dia do diagnóstico da MC apresentaram cultura negativa (Oliveira et al., 2013, Tomazi et al., 2018). Nestes casos, o uso de antibióticos não é justificado, visto que o microrganismo causador não está mais ativo na glândula mamária. Além disso, até 80% dos casos leves e moderados de MC causados por bactérias Gram-negativas têm cura espontânea, ou seja, o sistema imunológico da vaca é capaz de combater o agente infeccioso sem qualquer intervenção humana. Estudos recentes realizados na Universidade de Cornell (EUA) demonstraram que o uso de ceftiofur para tratamento de casos de MC causados por *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa mais frequente em casos de MC) não aumentou a taxa de cura clínica da doença, assim como não teve efeito na eliminação do patógeno e na carga bacteriana do leite em comparação com casos não tratados com antimicrobianos (Ganda et al., 2016, Ganda et al., 2017). A frequência de MC causada por bactérias Gram-negativas tem grande variação (20-60%) entre rebanhos leiteiros, sendo afetada principalmente pela higiene de ordenha e locais onde as vacas transitam e são alojadas. Com base no preposto, o uso de antibióticos é justificado em apenas 30-45% dos casos diagnosticados, os quais têm como causa principal patógenos Gram-positivos, em especial *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Estudos recentes têm demonstrado que a realização de tratamento seletivo de MC promove a redução do uso de antimicrobianos sem afetar negativamente a eficácia da terapia ou a saúde e potencial de produção das vacas leiteiras. Em um estudo realizado no Brasil, o tratamento de vacas com MC baseado em um PCF reduziu em 63% o uso de antimicrobianos sem afetar a cura clínica e bacteriológica de vacas (Santos e Tomazi, 2016). Do total de casos que não receberam tratamento antimicrobiano, apenas 4,7% necessitaram de intervenção antimicrobiana por não

apresentarem melhora do quadro clínico. Destes, 7,2% tiveram isolamento de bactérias Gram-negativas e 2,9% não apresentaram crescimento na cultura realizada na fazenda. Outros benefícios do tratamento seletivo de MC a redução do custo total com tratamento e mão-de-obra, redução dos riscos de resíduos de antimicrobianos no leite, e redução do risco de seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

A quem se aplica e quando implantar?

A realização de cultura na fazenda para o uso seletivo de antibióticos deve ser considerada como uma estratégia de refinamento no controle da mastite, e não a solução dos problemas do rebanho. Programas de cultura na fazenda têm pouco ou nenhum efeito sobre a prevenção de infecções intramamárias. Ou seja, quando bactérias são identificadas na cultura microbiológica do leite, o quadro infeccioso e inflamatório já ocorreu na vaca. Portanto, os maiores benefícios da prática são observados quando o rebanho já possui um bom programa de controle de mastite. Dentre as práticas preventivas contra a doença estão o uso de boas práticas de manejo de ordenha, adequada higiene de alojamentos e instalações, boa nutrição, e vacas em conforto e bem-estar.

Além disso, os trabalhadores da fazenda devem ser capacitados e estarem motivados a incluir mais uma atividade na sua (já corrida) rotina diária. O diagnóstico confiável de cultivo microbiológico é dependente de procedimentos cuidadosos de assepsia que iniciam na desinfecção do teto, passam pela coleta, acondicionamento e inoculação da amostra de leite, até chegar à leitura e interpretação dos resultados. Portanto, além dos recursos financeiros e de instalações para a implantação de um programa de cultura na fazenda, é importante ter pessoas com capacidade, interesse e tempo de realizar essa nova tarefa.

Uma vez certificado que a fazenda tem o perfil necessário para implantação de um programa de cultura, é hora de definir o nível de diagnóstico que se pretende atingir: será utilizado um método para identificação microbiológica em nível de grupo bacteriano (Gram-positivos, Gram-negativos ou cultura negativa; Figura 2) ou em nível de espécie? Independente da escolha, é essencial que se tenha um conhecimento mínimo das bactérias mais prevalentes em casos de mastite no rebanho. Isso é importante para descartar a presença de patógenos contagiosos como *Strep. agalactiae* e *Staph. aureus*. Tais microrganismos exigem estratégias de controle mais drásticas como *blitz terapia*, segregação para a ordenha, e até mesmo o descarte de vacas. Além disso, a frequência de resultados falso-negativos em análises de cultura do leite pode chegar a 40% dependendo da cepa de *Staph. aureus* prevalente no rebanho. Portanto, antes de se fazer o investimento para implantação de um programa de cultura na fazenda, é recomendável coletar amostras de vacas com histórico de alta CCS ou reativas ao teste de CMT para descartar a presença de patógenos contagiosos no rebanho.

Fazendas de maior sucesso na implantação e manutenção de um programa de cultura na fazenda são aquelas que realizam adequado manejo preventivo de mastite no rebanho, com baixa ou nenhuma prevalência de patógenos contagiosos, e com trabalhadores motivados e satisfeitos com o trabalho que desempenham na fazenda.

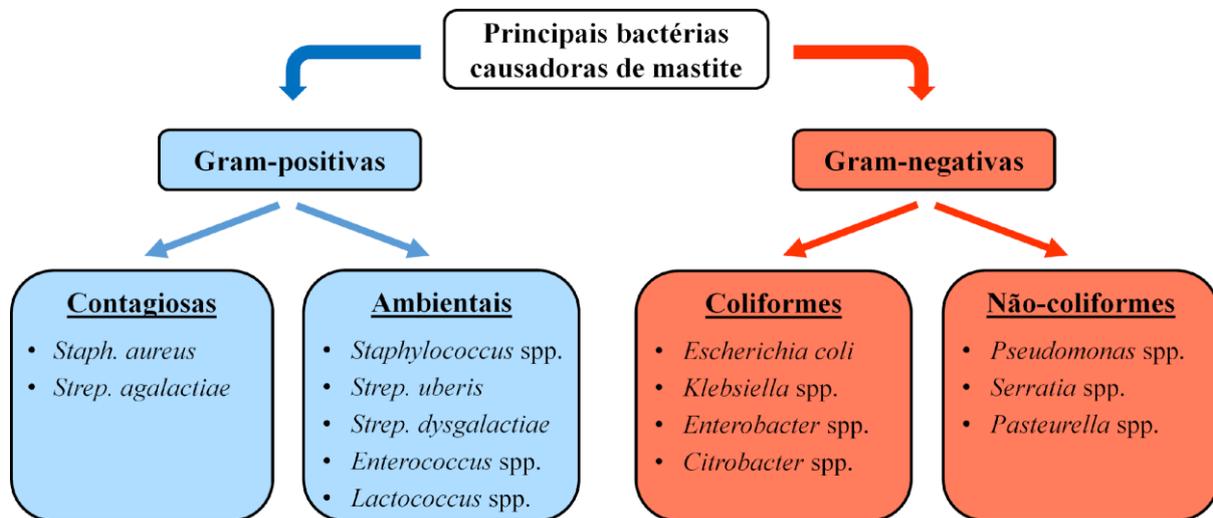


Figura 2 – Classificação das principais espécies bacterianas causadoras de mastite em vacas leiteiras.

O que é preciso para implantar o PCF?

Primeiramente, é necessário definir uma área para instalação do laboratório. Resumidamente, deve ser um ambiente limpo, iluminado, sem grandes flutuações de temperatura e com pouca circulação de pessoas. Dois equipamentos são essenciais em um laboratório de cultura na fazenda: (a) geladeira com freezer; (b) estufa microbiológica. A geladeira deve ser usada apenas para armazenar os meios de cultura e as amostras de leite que serão inoculadas no dia da coleta. Por outro lado, a estufa deve ser capaz de manter a temperatura estável (35-37°C) e umidade adequada para promover o crescimento bacteriano.

Além dos equipamentos, os seguintes materiais de consumo são necessários para realização de procedimentos de cultura na fazenda:

- Meios de cultura apropriados para promover o crescimento de patógenos causadores de mastite;
- Luvas descartáveis;
- Canetas para marcação das placas;
- Racks (grades) para colocação das amostras;
- Suabes ou alças descartáveis estéreis;

- Desinfetantes de superfície (ex., álcool 70% iodado).

Somado a tudo isto, é necessário realizar a capacitação da equipe que realizará a atividade no rebanho, além da constante orientação de um médico veterinário.

Quais meios de cultura podem ser utilizados?

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos diversos meios de cultura para uso em PCF, os quais possibilitaram a identificação de grupos de microrganismos causadores de mastite, ou até mesmo o diagnóstico em nível de espécie. Os principais meios de cultura utilizados em PCF e suas respectivas características estão descritas abaixo.

Meio de cultura não seletivo (Agar sangue): possibilita o crescimento de qualquer microrganismo aeróbio presente no leite (Figura 3). Meios de cultura não seletivos permitem identificar a presença ou ausência de bactéria na amostra de leite.



Figura 3 – Placas compostas pelo meio de cultura Agar sangue (não-seletivo) sem crescimento microbiano (A) e com crescimento de diferentes espécies bacterianas (B e C).

Placas bipartidas (Agar sangue/MacConkey): as biplacas são compostas por um meio não-seletivo (Agar sangue) em uma das metades, enquanto a outra é composta por meio seletivo para bactérias Gram-negativas (Agar MacConkey). Esta placa permite identificar três tipos de resultados, conforme ilustrado na Figura 4.

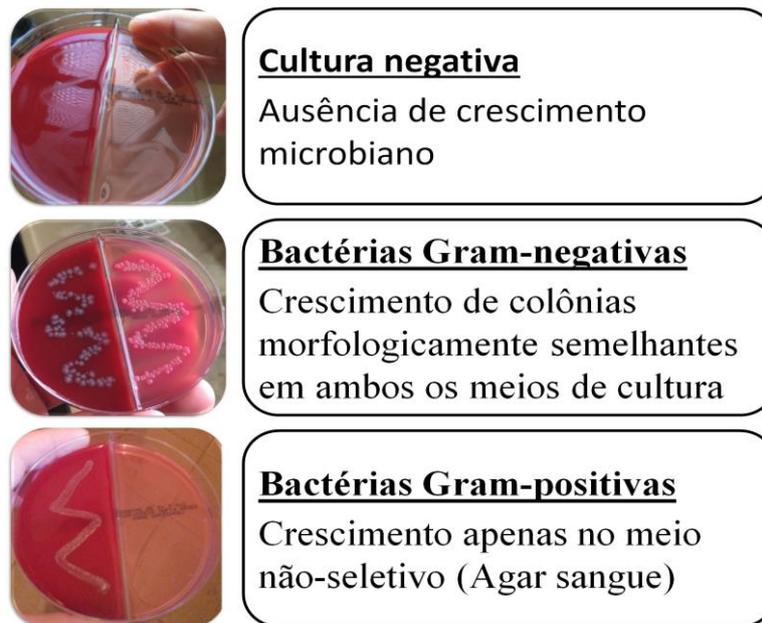


Figura 4 - Interpretação dos resultados de cultura em placas bipartidas (Agar Sangue/ MacConkey).

Meios cromogênicos seletivos – esta é a tecnologia de cultura na fazenda mais moderna disponível atualmente. Nestes meios, os substratos cromogênicos específicos são clivados por enzimas produzidas pelas espécies bacterianas, os quais permitem a identificação dos principais patógenos causadores de mastite em nível de espécie (Figura 5). No mercado brasileiro existem diferentes produtos comerciais, e a interpretação das cores deverá seguir recomendações do fabricante das placas. Dentre as possibilidades de meios cromogênicos disponíveis no Brasil, a placa Accumast® (FERA, Diagnostics and Biologicals, EUA) apresentou a melhor precisão de diagnóstico quando comparada a outros três meios de cultura disponíveis nos EUA. Um dos diferenciais desta placa é capacidade de armazenamento em temperatura ambiente (25°C) por até 6 meses. Ao comparar indicadores de eficácia com o tratamento sem cultivo prévio, o uso da placa Accumast® resultou nos seguintes benefícios:

- 62% em média na redução de uso de antibióticos
- 4,9% de aumento na taxa de cura aos 21 dias após o diagnóstico
- 12,4% de redução na taxa de descarte/morte de vacas aos 60 dias após o diagnóstico
- 2,9 dias a menos das vacas acometidas no lote de hospital da fazenda
- 21,4% de redução na incidência de MC. Este resultado está associado com a redução de casos recorrentes devido ao uso de tratamentos mais assertivos.



Figura 5 – Meio de cultura cromogênico (Accumast®), o qual possibilita a identificação e diferenciação das principais espécies bacterianas causadoras de mastite de acordo com a coloração do crescimento das colônias.

Quadro 1 - Características e potencial diagnóstico dos principais meios de cultura utilizados em programas de tratamento seletivo de MC em rebanhos leiteiros

Item	Meio não seletivo	Placas bi-partidas	Meios cromogênicos
Nível de diagnóstico	Presença/ausência	Grupo	Espécie
Interpretação	Positivo/negativo	Sem crescimento Bactérias Gram-positivas Bactérias Gram-negativas	Sem crescimento Espécie bacteriana
Custo	\$	\$\$	\$\$\$
Quem não tratar	Cultura negativa	Cultura negativa Bactérias Gram-negativas	Cultura negativa Bactérias Gram-negativas Espécies não responsivas aos antibióticos
Estimativa de redução de antibiótico	30-40%	Aproximadamente 60%	Mais de 60% (dependendo do protocolo adotado).

Programas de cultura na fazenda

Ao escolher entre o programa de cultura a ser implantado, é importante considerar atributos relacionados aos meios de cultura (Quadro 1) como: precisão do teste, custo, prazo de validade, condições de armazenamento, facilidade de uso e suporte técnico oferecido pelo fabricante. Entretanto, o mais importante é definir qual o nível de diagnóstico se necessita atingir no rebanho. Isso irá depender dos protocolos de tratamento a serem adotados e da capacitação dos responsáveis pela realização e interpretação dos resultados de cultura. Se a escolha for tratar todos os casos de mastite com crescimento bacteriano, o uso de um meio não seletivo será suficiente. No entanto, como o nível de diagnóstico é baixo, recomenda-se o tratamento das vacas com culturas positivas com antibióticos de amplo espectro. Por outro lado, se o protocolo de tratamento de mastite em uma fazenda determinar que apenas os casos com identificação de bactérias Gram-positivas serão tratados com antibióticos, um sistema de cultura que permita diferenciar entre o grupo bacteriano (Gram-positivo vs. Gram-negativo ou sem crescimento) será necessário. Por fim, em um programa mais refinado, em que a fazenda usará protocolos de tratamento específicos com base na resposta das espécies bacterianas aos antibióticos, um sistema que permita a diferenciação de espécies (meios cromogênicos) será a melhor opção. Na figura 6, esta apresentado um fluxograma de sugestão de abordagem terapêutica em vistas dos resultados obtidos nas culturas microbiológicas.

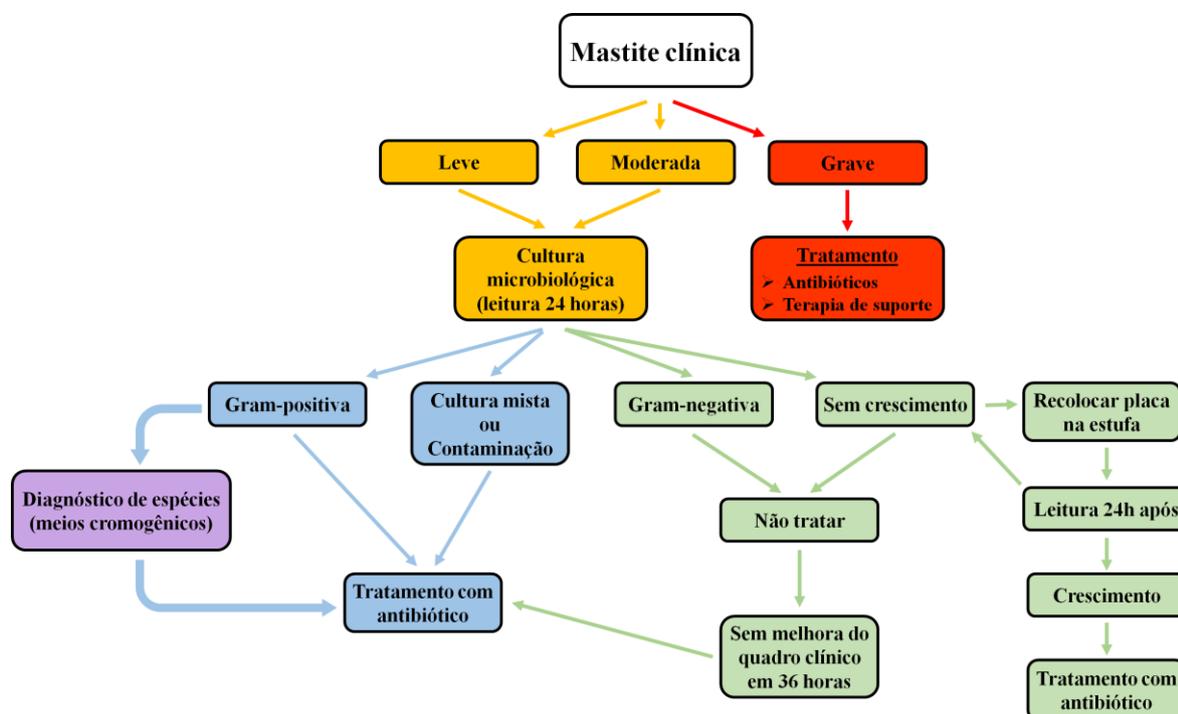


Figura 6 – Esquema ilustrando um PCF para tratamento seletivo de mastite.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Protocolos de tratamento de mastite são mais eficazes quando baseados no diagnóstico do patógeno causador. Programas de cultura na fazenda permitem o uso mais responsável de antimicrobianos em rebanhos leiteiros, sem afetar negativamente a frequência de novos casos de mastite e os índices de produtividade e qualidade do leite. Antes de implantar estas estratégias, é essencial consultar um especialista em controle de mastite, o qual poderá auxiliar o produtor na escolha do programa mais adequado para a realidade e situação do seu rebanho.

REFERÊNCIAS

- Ganda, E. K., R. S. Bisinotto, S. F. Lima, K. Kronauer, D. H. Decter, G. Dikonou, Y. H. Schukken, and R. C. Bicalho. 2016. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. **Scientific reports** 6:37565.
- Ganda, E. K., N. Gaeta, A. Sipka, B. Pomeroy, G. Dikonou, Y. H. Schukken, and R. C. Bicalho. 2017. Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. **Microbiome** 5(1):74.
- Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011a. 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** 94(9):4441-4456.
- Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011b. 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** 94(9):4457-4467.
- Oliveira, L., C. Hulland, and P. L. Ruegg. 2013. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **J Dairy Sci** 96(12):7538-7549.
- Santos, M. V., Tomazi, T. Atualizações e últimas tendências no controle e tratamento de mastites. 2016. In: Anais do VI Simpósio Brasil Sul de Bovinocultura de Leite - Chapecó, SC. **Associação Catarinense de Medicina Veterinária - Núcleo Oeste**. pp. 147-165.
- Tomazi, T., G. C. Ferreira, A. M. Orsi, J. L. Goncalves, P. A. Ospina, D. V. Nydam, P. Moroni, and M. V. Dos Santos. 2018. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. **Prev Vet Med** 161:9-18.

AUTORES

Rodrigo Carvalho Bicalho – Universidade de Cornell, EUA. rcb28@cornell.edu

Tiago Tomazi – Universidade de Cornell, EUA. tt489@cornell.edu

Lucas Carvalho Siqueira – Professor no Mestrado Profissional em desenvolvimento Rural (UNICRUZ); lsiqueira@unicruz.edu.br

Patricia Wolkmer – Professora Medicina veterinária (UNICRUZ); pwolkmer@unicruz.edu.br

Chester Patrique Batista – Mestre em desenvolvimento rural (UNICRUZ); Doutor Gerente linha leite, Zoetis. batista_chester@hotmail.com

Corpo Editorial Técnico da Circular Técnica do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural

Daniele Mariath Bassuino
Diego Pascoal Gole
Juliane Nicolodi Camera
Mauricio Paulo Batistella Pasini
Roberta Cattaneo

Membros Externos do Corpo Editorial Técnico da Circular Técnica do MPDR

Bárbara Estevão Clasen - UERGS
Gisele Silva Boos – Justus Liebig Universität Gießen | JLU · Institut für Veterinär-Pathologi

Editoração e Layout

Mauricio Paulo Batistella Pasini

Comissão Editorial Unicruz

Valeska Martins da Silva;
Antonio Escandiel de Souza;
Claudia Maria Prudêncio de Mera.
Vitor Sperotto
Dinara Hansen da Costa;
Rodrigo de Rosso Krug;
Fábio César Junges.

Coordenadora da Comissão

Bibliotecária - Eliane Catarina Reck da Rosa

C578 Circular Técnica do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural [recurso eletrônico] / Rodrigo Carvalho Bicalho [et al.], v.2, n.11, nov., 2020.- Cruz Alta/ RS: Unicruz - Centro Gráfico, 2020. 20 p.: il.; color.

Mensal
ISSN 2675-0171

1. Cultura Microbiológica. 2. Mastite Clínica (MC). 3. Rebanho leiteiro. I. Bicalho, Rodrigo Carvalho. II. Tomazi, Tiago. III. Siqueira, Lucas Carvalho. IV. Wolkmer, Patricia. V. Batista, Chester Patrique. VI. Título.

CDU 619:636.2.034

Catálogo Bibliotecária Eliane Catarina Reck da Rosa CRB-10/2404