

CULTURA MICROBIOLÓGICA EM PLACAS DE CULTIVO CROMOGÊNICOS PARA O DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE MASTITE BOVINA COMO ESTRATÉGIA PARA A REDUÇÃO DO USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO DE LEITE

**EDERSON DOS SANTOS¹; ANTONIO AMARAL BARBOSA²; BRUNA MURADÁS
ESPERON²; EDUARDO XAVIER²; JOSIANE DE OLIVEIRA FEIJÓ²; EDUARDO
SCHMITT³**

¹Universidade federal de Pelotas – edersonnupeec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nupeec@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – schimtt.edu@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O uso demasiado de antibióticos como agente terapêutico em animais e seres humanos assim como seu resíduo no meio ambiente aumenta o risco de desenvolvimento de resistência cruzada a antimicrobianos. Isso se deve à exposição de doses subinibitórias às bactérias, proporcionando a seleção de uma classe de microrganismos super-resistentes a uma gama de antibióticos (GULLBERG et al. 2011; ANDERSSON & HUGHES, 2014; SINGH & BHUNIA, 2019).

Em bovinos leiteiros umas das principais enfermidades que necessita do uso massivo de antibióticos é a mastite (RUEGG, 2017), doença inflamatória da glândula mamária. Esta causa grande desafios aos produtores, visto que gera grande impacto econômico às propriedades pois reduz a produção e a qualidade do leite, além de gerar custos com tratamentos e o descarte precoce de vacas por perda funcional de um ou mais quartos da glândula mamária (GONÇALVES et al. 2020; HE et al. 2020).

O prejuízo estimado da mastite clínica para cada caso é de aproximadamente R\$ 380,00 considerando custos diretos – descarte de leite, tratamento e veterinário – sendo evidenciado que 80% deste valor é decorrente do descarte de leite pelo uso de antibióticos nos tratamentos (SANTOS et al. 2020, dados ainda não publicados).

Segundo pesquisas recentes, 10% a 40% de amostras de leite coletadas de animais acometidos por mastite clínica para análise microbiológica não apresenta crescimento em cultivo *in vitro*, o que na prática significa que tratam-se de infecções que não necessitam de tratamento à base de antibióticos (Roberson, 2003; Lago et al. 2011). Isso expressa a nítida necessidade de conscientização de médicos veterinários, produtores rurais e da população em geral sobre o uso desnecessário e o risco do uso indiscriminado de antibióticos tanto na saúde humana quanto animal.

Uma das estratégias mais inovadoras dos últimos anos na área de diagnóstico para a mastite é a adoção de culturas bacterianas em placas que contém meios cromogênicos seletivos. Tal tecnologia foi desenvolvida especialmente para que o diagnóstico bacteriológico possa ser realizado em um curto período, dentro da própria fazenda leiteira, com o auxílio de uma pequena estufa (GANDA et al. 2016), permitindo aos técnicos e produtores tomarem decisões mais rápidas e estratégicas com base no conhecimento do agente etiológico envolvido (LAGO et al. 2011).

Diante da problemática da mastite e tendo em vista a necessidade do uso racional de terapias antimicrobianas, a adoção de culturas bacterianas em placas se torna uma alternativa que garante mais assertividade diagnóstica e terapêutica.

Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da realização do diagnóstico etiológico da mastite na própria fazenda, pelo método de cultura microbiológica em placas de cultivo cromogênicos, sobre a redução do uso de antimicrobianos e do descarte do leite.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira comercial localizada no Município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Para o presente estudo foram utilizados registros do banco de dados da fazenda. Os resultados das análises de culturas em placas de 100 animais de 2019, foram compilados, dentre aproximadamente 500 registros de vacas lactantes.

Os dados foram extraídos através de dois *softwares* denominados IDEAGRI® e DelPro®. O banco de dados era atualizado por um profissional treinado uma vez por semana. O método de cultura em placas, tem um custo médio de R\$ 18,00 por exame. As amostras neste estudo foram consideradas positivas se uma ou mais colônias crescessem após a cultura na placa, sendo que as que não apresentassem crescimento, eram classificadas como negativas para a cultura.

A quantidade de leite descartado foi analisada com base na média geral de produção de leite/dia do rebanho que era de 30 litros por animal. Além disso eram anotados os princípios ativos utilizados e os microrganismos que predominaram no crescimento das placas. O preço do leite utilizado para a realização dos cálculos foi baseado no preço máximo estabelecido pela CONSELEITE-RS em março de 2020 (R\$ 1,32 por litro de leite), sendo aproximadamente o que a propriedade recebia por litro de leite produzido no período considerado no estudo.

Os preços dos medicamentos (intramamários e injetáveis) utilizados no tratamento de mastite foram baseados em uma média de preços de três agropecuárias locais. Os valores dos antibióticos utilizados para quantificar o custo do tratamento de mastite estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Valores dos antibióticos utilizados para quantificar o custo do tratamento de mastite.

ANTIBIÓTICOS	VALOR
Clamoxil*	R\$ 65,80
Enrofloxacin 10%*	R\$ 28,80
Ciprolac	R\$ 13,90
Spectramast	R\$ 9,80

* dose média utilizada por animal

Segundo os dados levantados, em relação aos protocolos de tratamento da propriedade, eram utilizados nos quadros de mastite causados por bactérias, os seguintes tratamentos de acordo com o agente etiológico envolvido: *i)* Gram negativas - Tratamento 1 (T1, com um custo de R\$ 353,15) o qual consistia na aplicação de três dias de ciprofloxacina (Ciprolac) intramamário (IMM) e três dias de enrofloxacin 10% na dose de 7,5 miligramas por quilo (mg/Kg) por via intramuscular (IM), ambas com 24 horas de intervalo entre as aplicações; *ii)* Gram positivas: T2 (com um custo de R\$ 420,55) o qual consistia na aplicação de cinco dias de ciprofloxacina IMM e três dias de enrofloxacin 10% com dose de 7,5 mg/Kg IM, com 24 horas de intervalo entre as aplicações; *iii)* *Streptococcus agalactiae* e quadros em que o animal não apresentava evolução do quadro clínico: T3 (com um custo de R\$ 427,25) em que era administrado Ceftiofur (Spectramast) IMM por quatro dias, com intervalo de 24 horas e duas doses de Amoxicilina (Clamoxil) na dose de 15 mg/Kg IM, com intervalo de 48 horas.

Vacas cujas amostras semeadas nas placas apresentavam crescimento de *Escherichia coli* ou que não apresentavam crescimento, não eram tratadas com antimicrobianos (LAGO et al. 2011; PINZÓN-SÁNCHEZ et al. 2011; SUOJALA et al. 2013), exceto as mastites caracterizadas como de grau 3.

O custo estimado do veterinário para cada caso de mastite estava em torno de R\$ 5,45, levando em consideração que para cada caso o profissional levava em torno de 15 minutos, e como a propriedade tem um programa denominado Programa Trainee, este recebe um salário de aproximadamente R\$ 3.500.

De acordo com os protocolos adotados pela fazenda, no tratamento de mastite clínica, era necessário um total de sete dias para o protocolo T1, e oito dias para T2 e T3. Sendo seis e sete dias respectivamente para o descarte do leite em decorrência dos resíduos e mais um dia para garantir sua ausência no leite.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados das culturas na tabela 4, 55 casos não obtiveram crescimento de agente etiológico ou foram caracterizados com crescimento de *Escherichia coli* (com exceção de 3 casos que foram tratados por apresentarem grau 3 de mastite clínica) demonstrando que não há necessidade de administrar protocolos de tratamento de amplo espectro em todos os casos onde não são realizadas culturas na fazenda (PINZÓN-SÁNCHEZ et al. 2011). Dessa forma, o custo total caso fosse realizado o tratamento de todos os casos presentes nesse período (n= 100 casos), seria de aproximadamente R\$ 42.055,00 (baseado no protocolo T2 de amplo espectro para bactérias gram positivas). Todavia, com a utilização das culturas em placas (48 casos tratados) totalizou R\$ 20.699,60, apresentando uma economia de 48,5%, correspondente a aproximadamente R\$ 20.419,40 (a partir do cálculo de R\$ 21.355,40 – R\$ 936,00, equivalente ao custo de 52 placas necessárias para o restante das 100 análises realizadas). Assim como uma redução expressiva nos custos com antibióticos, houve redução nos custos pelo menor volume de leite descartado. Dos R\$ 20.699,60 gastos com os tratamentos realizados, 72,3% correspondem ao custo descarte, 22,2% ao uso de antibióticos e 5,4% com mão-de-obra do Médico Veterinário e custo com meios de cultura cromogênicos.

Tabela 4. Principais agentes causadores de mastite clínica em amostras de culturas em placas da propriedade.

AGENTE ISOLADOS	QUANTIDADE	%
Sem crescimento	49	49
<i>Str. Uberis</i>	17	17
<i>Str. agalactiae/Str. Dysgalactiae</i>	6	6
<i>Escherichia coli</i>	6	6
<i>Str.agalactiae</i>	5	5
<i>Enterobacter sp.</i>	2	2
Outros G+/G-	2	2
<i>Str. Dysgalactiae</i>	2	2
<i>Sf. coagulase negativa</i>	2	2
<i>Protoheca ssp</i>	2	2
<i>Sf. Aureus</i>	1	1
<i>Sf. Haemoliticus</i>	1	1
<i>Str. Uberis/Klebsiella sp.</i>	1	1
<i>Enterococcus spp.</i>	1	1
Outros G-	1	1
<i>Escherichia coli/Str. Dysgalactiae</i>	1	1
<i>Str. agalactiae/Enterobacter sp.</i>	1	1
TOTAL	100	100

**Streptococcus* – *Str.* **Staphylococcus* – *Sf.*

Com a utilização de cultura em placas para identificar os agentes etiológicos da mastite clínica de vacas e a instituição de tratamentos apenas em vacas que apresentam crescimento microbiológico, houve uma economia nesta propriedade (com este perfil de agentes em 100 culturas) de R\$ 20.419,40 e uma redução no descarte de 12.660 litros de leite, enfatizando a importância da realização da

cultura em placas, reduzindo assim o uso de antibióticos e possíveis quadros de resistência.

Diante do atual cenário de resistência a antibióticos, a cultura em placas com meios cromogênicos se torna uma alternativa viável e eficaz, direcionando uma terapia seletiva, de acordo com a etiologia e a epidemiologia envolvida na ocorrência dessa enfermidade. Isto tem se mostrado cada vez mais fundamental para traçar métodos de prevenção e controle, com formas alternativas que possam substituir e diminuir os protocolos de amplo espectro utilizados de forma errônea nas fazendas (HOGEVEEN et al. 2011). Esta estratégia possibilita ainda, a identificação e tratamento apenas dos animais que necessitam de fato desse protocolo terapêutico, melhorando a assertividade do tratamento com base no agente etiológico.

4. CONCLUSÕES

A cultura em placas demonstrou-se efetiva no período estudado, visto que reduziu o custo com tratamento da mastite clínica com antibióticos, bem como reduziu o descarte de leite produzido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 7, p. 465, 2014.
- GANDA, E.K.; BISINOTTO, R.S.; DECTER, D.H. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. **PloS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. e0155314, 2016.
- GONÇALVES, J.L.; KAMPHUIS, C.; VERNOOIJ, H.; ARAÚJO JR, J.P.; GRENFELL, R.C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K.L.; HOGEVEEN, F.H.; DOS SANTOS, M.V. Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, p. 105473, 2020.
- GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.G.; IIBACK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D.I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e1002158, 2011.
- HE, W.; MA, S.; LEI, L.; HE, J.; LI, X.; TAO, J.; WANG, X.; SONG, S.; WANG, Y.; WANG, Y.; SHEN, J.; CAI, C.; WU, C. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 242, p. 108570, 2020.
- HOGVEEN, H.; PYORALA, S.; WALLER, K.P.; HOGAN, J.S.; LAM, T.J.G.M.; OLIVER, S.P.; SCHUKKEN, Y.H.; BARKEMA, H.W.; HILLERTON, J.E. Current Status and Future Challenges in **Mastitis Research. NMC Annual Meeting Proceedings**, Arlington, 23-26 January 2011, 36-48.
- 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**, Champaign, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.
- PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V.E.; RUEGG, P.L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 4, p. 1873–1892, 2011.
- ROBERSON, J.R. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 223-34, viii, 2003.
- RUEGG, P.L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
- SINGH, A. K.; BHUNIA, A.K. Animal-Use Antibiotics Induce Cross-Resistance in Bacterial Pathogens to Human Therapeutic Antibiotics. **Current microbiology**, New York, v. 76, n. 10, p. 1112-1117, 2019.
- SUOJALA L.; KAARTINEN L.; PYÖRÄLÄ S. Treatment for bovine Escherichia coli mastitis – an evidence-based approach. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, 36, 521–31, 2013.