



unifaema

CENTRO UNIVERSITÁRIO FAEMA – UNIFAEMA

RAFAEL BATISTA DE LIMA OLIVEIRA

**TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM AMOSTRAS DE TETOS DE VACAS TRATADAS
COM ANTISSÉPTICOS**

**ARIQUEMES - RO
2024**

RAFAEL BATISTA DE LIMA OLIVEIRA

**TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM AMOSTRAS DE TETOS DE VACAS TRATADAS
COM ANTISSÉPTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia do Centro Universitário FAEMA – UNIFAEMA como pré-requisito para obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientador (a): Prof. MSc. Luciana Ferreira.

**ARIQUEMES - RO
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O48t Oliveira, Rafael Batista de Lima.
 Teste de disco difusão em amostras de tetos de vacas tratadas com antissépticos. / Rafael Batista de Lima Oliveira. Ariquemes, RO: Centro Universitário Faema – UNIFAEMA, 2024.
 26 f. ; il.
 Orientadora: Profa. Ma. Luciana Ferreira.
 Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Agronomia – Centro Universitário Faema – UNIFAEMA, Ariquemes/RO, 2024.

1. Mastite. 2. Profilaxia. 3. Disco difusão. 4. Clorexidina. I. Título. II. Ferreira, Luciana.

CDD 630

Bibliotecária Responsável
Isabelle da Silva Souza
CRB 1148/11

RAFAEL BATISTA DE LIMA OLIVEIRA

**TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM AMOSTRAS DE TETOS DE VACAS TRATADAS
COM ANTISSÉPTICOS**


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Agronomia do Centro Universitário
FAEMA – UNIFAEMA como pré-requisito para
obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientador (a): Prof. MSc. Luciana Ferreira.

BANCA EXAMINADORA



Prof. MSc. Luciana Ferreira
Centro Universitário Faema - UNIFAEMA



Prof. Dr. Matheus Martins Ferreira
Centro Universitário Faema - UNIFAEMA



Prof. MSc. Adriana Ema Nogueira
Centro Universitário Faema - UNIFAEMA

**ARIQUEMES – RO
2024**

Dedico este trabalho aos meus pais, pois sem o apoio e incentivos deles, essa conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, que me abençoou e me guiou durante toda essa longa caminhada.

Aos meus pais, Evaldo e Vanilda, que tanto se esforçaram e me apoiaram desde o início desse desafio, pois sem o amor deles, eu jamais teria alcançado este sonho.

Agradeço a minha orientadora Luciana, pela disposição e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a coordenadora Adriana Ema que me acolheu e não mediu esforços para me ajudar a chegar até aqui.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização de mais um sonho.

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você: Ele nunca o deixara, nunca o abandonará. Não tenha medo! Não desanime!” -
Deuteronômio 31:8

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar e avaliar a eficácia de antissépticos comerciais através do método Teste Disco Difusão em bactérias presentes nos tetos e leite de vacas leiteiras. Avaliou-se também a Contagem Bacteriana Total (CBT) através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP), para comprovar a eficácia dos produtos mediante aplicação *in-vivo* junto a medidas profiláticas. Para o teste de sensibilidade, isolou-se em meio de cultura que sinaliza a possível presença dos microrganismos que possam causar inflamação da glândula mamaria bovina, as amostras dos tetos e do leite oriundas de 25% do rebanho ordenhado de duas propriedades distintas. Os animais utilizados nos ensaios foram identificados com o auxílio da identificação padrão das propriedades, não havendo troca de animais. Ocorreram quatro amostragens durante o período do trabalho, que foram efetuadas a cada 90 dias, sendo duas delas antes da introdução do antisséptico e duas após. Os antissépticos utilizados no teste consistem em produtos comerciais a base de Clorexidina (2%), Iodo (2,25%) e Hipoclorito de Sódio (2,5%), além destes, foi introduzido um teste positivo com discos comerciais de antibiótico Vancomicina e um teste negativo utilizando água destilada. Diante das avaliações estatísticas dos resultados do teste de sensibilidade, comprovou-se que o produto comercial a base de clorexidina apresentou maior halo de inibição de microrganismos, confirmando assim a sua eficiência no controle dos patógenos. Em consonância com este dado, foi constatado também o resultado positivo da avaliação da CBT após o uso do antisséptico, onde houve redução da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) das amostras dos tetos e do leite, atestando assim a veracidade da sua ação.

Palavras-chave: mastite; profilaxia; disco difusão; clorexidina.

ABSTRACT

The aim of this study was to test and evaluate the efficacy of commercial antiseptics using the Disk Diffusion Test method on bacteria present in the teats and milk of dairy cows. The Total Bacterial Count (TBC) was also evaluated using the Standard Plate Count (SPC) method, in order to prove the efficacy of the products through in-vivo application along with prophylactic measures. For the sensitivity test, teat and milk samples from 25% of the milked herd from two different farms were isolated in a culture medium that indicates the possible presence of microorganisms that can cause inflammation of the bovine mammary gland. The animals used in the tests were identified with the help of standard farm identification, and there were no changes of animals. Four samples were taken every 90 days during the study period, two before the antiseptic was introduced and two after. The antiseptics used in the test consisted of commercial products based on Chlorhexidine (2%), Iodine (2.25%) and Sodium Hypochlorite (2.5%), in addition to these, a positive test was introduced with commercial disks of the antibiotic Vancomycin and a negative test using distilled water. Statistical evaluations of the sensitivity test results showed that the commercial chlorhexidine-based product had the largest halo of inhibition of microorganisms, thus confirming its efficiency in controlling pathogens.

Keywords: mastitis; prophylaxis; disk diffusion; chlorhexidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diluição seriada das amostras.....	19
Figura 2 - Placas CPP, contendo amostra de CBT.....	19
Figura 3 - Isolado de bactérias para teste de sensibilidade.....	20
Figura 4 - Teste de sensibilidade Disco-Difusão.....	21
Tabela 1 - Halos de inibição dos antissépticos comerciais (em mm)	22
Tabela 2 - Médias da CBT dos tetos da Propriedade “A”	23
Tabela 3 - Médias da CBT do leite da Propriedade “A”	24
Tabela 4 - Médias da CBT dos tetos da Propriedade “B”	25
Tabela 5 - Médias da CBT do leite da Propriedade “B”	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 GERAL	13
1.2.2 ESPECÍFICOS	13
1.2.3 HIPÓTESE	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DE RONDÔNIA	14
2.2 MASTITE	14
2.3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	15
2.4 INSTRUÇÕES NORMATIVAS IN 76 E IN77	16
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	17
3.1 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos mais saudáveis e seguros tem crescido exponencialmente ao longo dos anos, impulsionada pela ampla divulgação de surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA). Porém, segundo (NERO et al., 2003), poucos estudos e informações nessa área são divulgados no Brasil. Ainda segundo o autor, o leite sem um tratamento adequado pode tornar-se uma das principais fontes das ETA's. Segundo Borges et al. (2010), as contaminações por *Salmonella* em queijos frescos são decorrentes do uso de leite cru na fabricação.

Esses níveis microbiológicos estão diretamente ligados as doenças que acometem os bovinos, um exemplo disto é a mastite bovina, amplamente relacionada aos rebanhos leiteiros. A mastite trata-se de um processo inflamatório na glândula mamária e caracteriza-se principalmente pela redução da produção de leite. A manifestação da infecção pode ser clínica ou subclínica, sendo que a última, segundo Pedrini e Margatho (2003), acarreta uma redução de 5% a 25% da produção leiteira. Além do potencial risco à saúde do consumidor, ela pode veicular agentes etiológicos de zoonoses (COSTA, 1998).

A EMBRAPA (2002), descreve que os agentes mais comuns causadores da mastite são os estreptococos e estafilococos. Ainda segundo Mendonça et al. (1999), os patógenos mais importantes da mastite são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis*.

Segundo Cruz (2022), a atividade leiteira no município de Colorado do Oeste -RO teve uma produção 42,49 milhões de litros, com média diária de 1,51 milhão de litros no mês de fevereiro de 2022. O mesmo afirma ainda que o município apresenta o melhor rebanho de gado leiteiro do estado.

Segundo dados da Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON, 2022), o estado tem um efetivo do rebanho bovino no total de 17.687.897 cabeças de gado, sendo que 2.896.053 milhões cabeças são de bovinos leiteiros. A produção média de leite por animal/dia em Rondônia no segundo semestre do ano foi de aproximadamente 4,9 litros. Se comparado com o maior estado produtor do país, Rio Grande Do Sul com uma produção média de 27 litros dia/animal, o estado tem muito trabalho pela frente. Segundo o órgão, o limitante da produção do estado são a disponibilidade de alimentos no período seco do ano e os altos valores microbiológicos contidos no leite, sendo reflexo de ordenhas com baixos níveis de higiene.

1.1 JUSTIFICATIVA

O leite produzido no estado de Rondônia é considerado um produto de baixa qualidade em virtude dos níveis bacteriológicos presente no mesmo, somando com uma baixa produtividade por animal, já que esses níveis de microrganismos estão diretamente ligados a diversas doenças e processos inflamatórios como, por exemplo, a mastite. O presente trabalho busca definir um produto antibacteriano eficiente, em conjunto com medidas profiláticas de higiene, e posteriormente, remodelar a realidade atual dos pequenos produtores da região então relação aos fatores descritos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

Avaliar o controle microbiológico do leite e dos tetos de vacas, através da Contagem Bacteriana Total (CBT), após a utilização de antissépticos disponíveis comercialmente com eficácia comprovada por meio do Teste Disco Difusão.

1.2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a contagem bacteriana total e contagem de células somáticas antes da utilização do antisséptico;
- Determinar a sensibilidade das bactérias envolvidas nos processos de infecções mamárias nas ordenhas da região a diferentes antissépticos utilizados;
- Verificar a eficácia de diferentes antissépticos no controle microbiano da ordenha de bovinos leiteiros por meio de teste de disco difusão em bactérias envolvidas no processo de infecções mamárias em bovinos na região;
- Determinar qual o melhor antisséptico avaliado por meio do teste disco difusão, para ser implantado nos processos de pré e pós-dipping;

1.2.3 HIPÓTESE

Os antissépticos disponíveis no mercado são eficazes contra os principais microrganismos causadores de mastite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DE RONDÔNIA

Rondônia é um dos principais estados produtores de leite no Brasil. De acordo com o IDARON, no ano de 2019, o estado produziu algo em torno de 3.628.440 milhões de litros de leite provenientes de aproximadamente 35 mil propriedades. A pecuária leiteira do estado é intensificando pela agricultura familiar e outros fatores naturais decisivos para a produção de leite a pasto. O estado conta com 97 indústrias de laticínios distribuídas em 35 municípios, que empregam cerca de 35 mil produtores.

Com a finalidade de promover o desenvolvimento, a sustentabilidade e competitividade da pecuária leiteira no estado, em 1999 foi criado o Programa de Apoio ao Desenvolvimento da Pecuária Leiteira – PROLEITE (EMATER, 2015). A SEAGRI (Secretaria de Estado Da Agricultura, Pecuária, Desenvolvimento e Regulação Fundiária é o órgão que gerencia o programa, enquanto a EMATER-RO é responsável pelas execuções das ações.

De acordo com dados do IDARON 2019, o município de Colorado do Oeste foi o 23º maior produtor de leite do estado, produzindo uma média aproximada de 70.600 litros de leite por dia, ficando atrás de municípios como Ouro Preto do Oeste, Jarú, Nova Mamoré, Ji-Paraná, Governador Jorge Teixeira, Urupá, Cacoal, Presidente Médici, Machadinho D'Oeste e Espigão D'Oeste que juntos, correspondem a 51% da produção estadual.

2.2 MASTITE

A mastite é uma doença inflamatória multifatorial da glândula mamária. As infecções intramamárias (IMI) são mais comumente causadas por bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.*, e muitas vezes também por fungos. Vista em rebanhos leiteiros entre o período de secagem e o início da lactação. Outros agentes causadores raros de mastite podem ser trauma ou produtos químicos tóxicos (HAXHIAJ. K et al, 2022).

Outro ponto trazido por HAXHIAJ K. et al (2022), é que há presença de alterações químicas e físicas no leite e aparência anormal da glândula mamária. Dependendo dos sinais e da gravidade, pode ser classificada como mastite clínica (MC) ou mastite subclínica (MSC). É comumente monitorada medindo a contagem de células somáticas (CCS) no leite, que se exceder 200.000 células/mL, a glândula mamária é considerada inflamada e isso sugere fortemente uma infecção.

Uma doença que vem acarretando grandes perdas para indústria leiteira, e no Brasil, avalia-se que que a mastite subclínica chega a atingir 48,64% nos rebanhos

bovinos e 42,2% nos rebanhos bubalinos, sendo o agente *Staphylococcus spp.* o principal causador (ACOSTA et al., 2016).

Em um estudo realizado por Dalla Libera et al. (2020), em 321 amostras de leite analisadas, exames bacteriológicos apontaram 46,73% de amostras com a presença de *Staphylococcus spp.* Nesta pesquisa usou-se alguns parâmetros para avaliar o leite como a contagem de células somáticas (CCS) o California Mastitis Test (CMT), a concentração hidrogeniônica (pH), a condutividade elétrica (CE), e afirma-se que a CCS e o CMT foram os melhores testes para diagnosticar a presença de mastite.

A ausência de higiene durante a ordenha gera a má qualidade do leite e favorece níveis de mastite na propriedade. Atualmente há exigências de boas práticas de fabricação por sistemas federais e industriais que beneficiam a matéria prima (WHITEHEAD; LAKE, 2018).

2.3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Entre os parâmetros de avaliação mais utilizados pode-se citar o California Mastitis Test (CMT), uma ferramenta de diagnóstico simples e amplamente utilizada para mastite subclínica, uma vez que pode ser empregado a campo instantes antes de efetuar a ordenha. Ele é usado mesmo em áreas onde existem instalações laboratoriais disponíveis para fins de diagnóstico e programas de monitoramento. O CMT geralmente pontua de 1 a 5, os resultados são então interpretados com base na quantidade de gelificação ou formação de coágulos. Normalmente, um sistema de pontuação de 0 (negativo) a 5 (fortemente positivo) é usado. Um resultado negativo ou uma pontuação de 1 geralmente indica que a vaca está livre de mastite, enquanto uma pontuação de 2 ou 5 sugere que a vaca pode ter mastite (BRITO J.R.F. et al. 1997).

Outro parâmetro muito difundido é a contagem de células somáticas (CCS), uma medida importante na avaliação da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária em animais produtores de leite. Vários fatores podem afetar a CCS no leite, incluindo infecção intramamária, idade do animal, estágio de lactação, época do ano e frequência de ordenha. A infecção intramamária é o principal fator que aumenta a CCS, pois as células somáticas são principalmente leucócitos (células brancas do sangue) que entram na glândula mamária em resposta à infecção (PALMA G.B, 2020). Há uma relação inversa entre a CCS e a produção de leite. À medida que a CCS aumenta, geralmente há uma diminuição na produção de leite. Isso ocorre porque a infecção e a inflamação da glândula mamária danificam o tecido produtor de leite e desviam os recursos do animal para combater a infecção (FILGUEIRAS E. A, 2011). FILGUEIRAS também relata que a CCS pode afetar a composição do leite. Que o aumento da CCS pode resultar em diminuição do teor de proteína, gordura, lactose e minerais no leite. Além disso, o leite com alta CCS pode ter um impacto negativo na qualidade dos produtos lácteos, como queijo e iogurte. Em resumo, a CCS é uma

ferramenta valiosa para monitorar a saúde da glândula mamária e a qualidade do leite. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor os fatores que afetam a CCS e desenvolver estratégias eficazes para controlar a mastite e reduzir a CCS.

No método de Contagem bacteriana total (CBT), considera-se que em condições normais, o leite é estéril ao ser secretado nos alvéolos do úbere, contudo na ordenha do leite, o mesmo pode ser contaminado por diversos microrganismos presentes nos canais lactíferos e no canal dos tetos. Em outros casos, com uma baixa higiene do local de ordenha, a contaminação pode ocorrer no corpo do úbere e nos tetos (FONSECA E SANTOS, 2000).

2.4 INSTRUÇÕES NORMATIVAS IN 76 E IN77

As Instruções Normativas 76 (IN 76) e 77 (IN 77), emitidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são de extrema importância para o setor leiteiro. Elas trazem diretrizes específicas relacionadas à qualidade do leite, abrangendo desde a produção até os critérios finais de qualidade dos leites pasteurizados.

O que difere as normativas é que a IN 76 estabelece os regulamentos técnicos para a identidade e qualidade do leite cru, do leite pasteurizado e do leite pasteurizado tipo A. Ela define padrões e critérios para garantir a segurança e qualidade do leite ao consumidor. Já na IN 77, são definidos critérios para a obtenção de leite de qualidade e seguro. Ela abrange desde a organização da propriedade, suas instalações e equipamentos, até a formação e capacitação dos responsáveis pelas tarefas cotidianas. Além disso, a IN 77 trata do controle sistemático de mastites, brucelose e tuberculose.

Segundo a Instrução Normativa IN 76 (MAPA, 2018), em leite cru refrigerado de tanque individual ou comunitários, a contagem padrão em placas não deve exceder o máximo permitido que é de 300.000 UFC/ml para CBT e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/mL, sendo estas médias geométricas obtidas através de análises trimestrais.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

Identificação e caracterização das propriedades

O trabalho foi desenvolvido no município de Colorado do Oeste – Rondônia no ano de 2020. Inicialmente foi feito um levantamento das propriedades em potencial no município para participarem do estudo, a fim de localizarmos duas propriedades para participar da pesquisa. As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – IFRO Campus Colorado.

Identificação dos animais que apresentam mastite subclínica e clínica

Na propriedade foram realizadas algumas verificações com os animais a fim de diagnosticar alguma forma de mastite. Para tabulação dos dados, foram selecionados 25% do rebanho ordenhado total das propriedades. Seguindo os procedimentos recomendado pela EMBRAPA (2015), inicialmente foram avaliados o úbere dos animais, observando se havia anormalidades como inchaço e vermelhidão e a textura do leite, se o mesmo apresentava coágulos ou uma forma aguada. Podendo este simples avaliação revelar o estágio mais aguda da infecção, a mastite clínica.

A segunda avaliação, amplamente difundido no país, é o teste de CMT (Califórnia Mastite Teste), o qual identifica por meio de reagentes misturados no leite a mastite na sua forma subclínica. Os procedimentos com o teste de CMT são baseados em quatro etapas: Coleta de Amostra, onde uma pequena quantidade de leite é coletada de cada quarto da vaca em uma paleta de teste. Cada compartimento da paleta corresponde a um quarto da vaca; seguido da adição do Reagente CMT que é uma solução de sabão, é então adicionado a cada amostra de leite na paleta. A quantidade de reagente adicionada é geralmente igual à quantidade de leite; após isso deve-se realizar a mistura e observação quando então é girada suavemente para misturar o leite e o reagente. Se a vaca tem mastite, a mistura se tornará gelatinosa ou formará um coágulo. Isso ocorre porque o reagente CMT reage com o DNA liberado das células somáticas no leite, que aumentam em número durante uma infecção; e finalmente interpretação dos resultados, onde são então interpretados com base na quantidade de gelificação ou formação de coágulos.

Coleta de amostras bacterianas do teto

Após a identificação dos animais a serem submetidos à ordenha na propriedade, foram feitas coletas das amostras bacterianas. As coletas foram realizadas utilizando-se meios de transporte para a condução das amostras ao

Laboratório de Microbiologia, do IFRO-Campus Colorado do Oeste. As amostras referentes superfície do teto, foram coletadas na parte mediana do teto da vaca, realizando movimentos circulares num raio de 1 cm², sendo uma coleta antes do pré dipping. As duas primeiras coletas foram as testemunha ou controle, no qual foi quantificado a CBT e realizado as identificações dos microrganismos e realizado disco-difusão. As demais coletas foram realizadas após a introdução dos antissépticos no pré dipping.

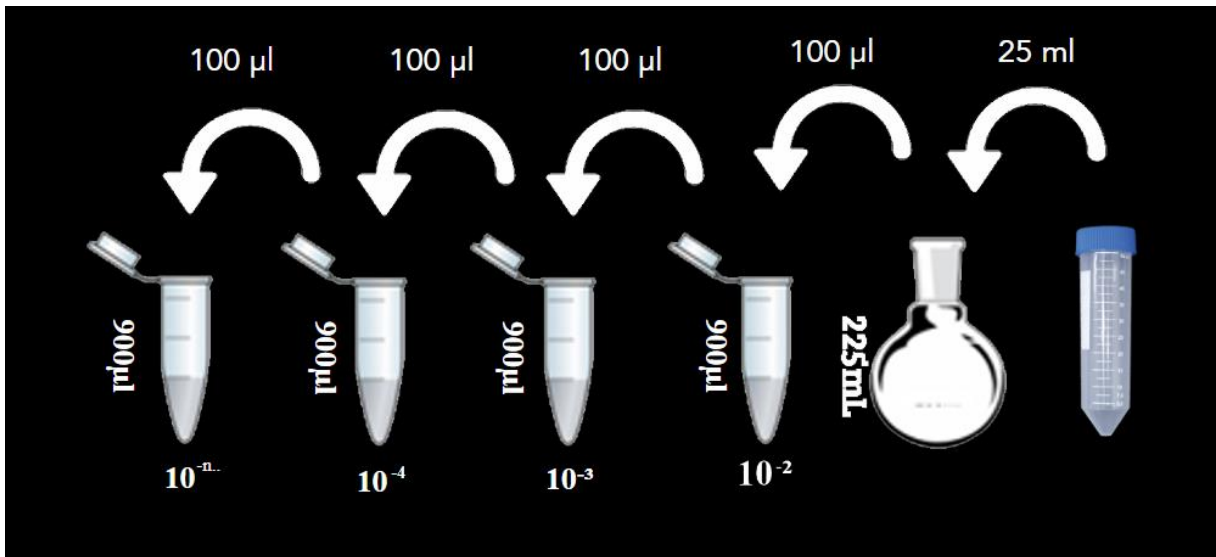
Coleta de amostras bacterianas do leite

Para as amostras de leite coletadas seguirá o padrão: após o pré-dipping foram desprezados os três primeiros jatos de leite, para assim coletarmos a amostra de cada animal, que totalizava aproximadamente 50ml de leite cada. Posteriormente as amostras foram armazenadas em caixa térmica e conduzidas ao laboratório.

Diluição seriada das amostras

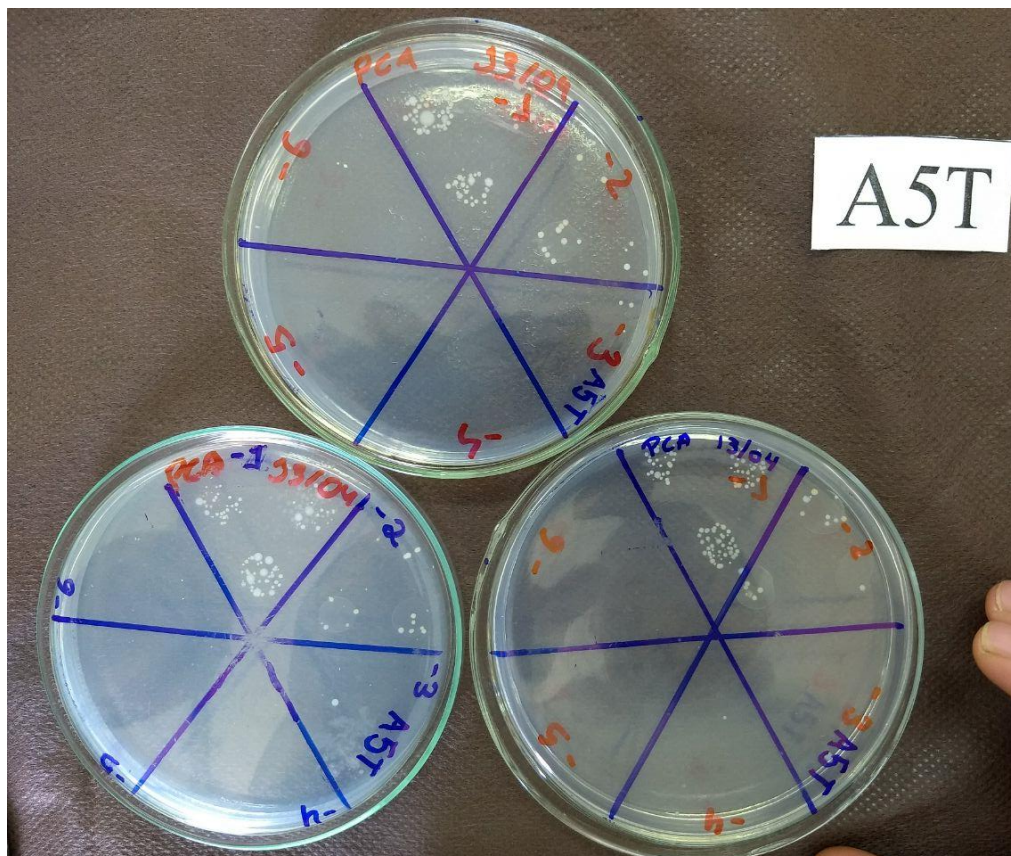
Com a obtenção das amostras de leite e da superfície dos tetos dos animais nas propriedades, as mesmas foram dirigidas ao laboratório onde passaram pelo processo de diluição seriada. As diluições usadas foram de 10⁻¹ a 10⁻⁶ e para obtê-las, foram misturados 25 ml em 225 ml de solução salina para obter a diluição 10⁻¹, as demais diluições foram feitas misturando 100ul da solução da diluição 10⁻¹ em 900ul e colocadas em tubos eppendorf de 1 ml, depois retirando 100ul da diluição 10⁻¹ e misturando a 900ul em outro tubo eppendorf para obter a 10⁻², seguindo assim até chegar na diluição 10⁻⁶ (Figura 1). Seguindo para a próxima etapa, as diluições foram dispersadas nas placas conforme a literatura (Figura 2) para possibilitar a contagem das unidades formadoras de colônia presentes no leite e nos tetos. Para melhor homogeneidade das amostras, foram realizadas triplicatas de cada amostra analisada. Após 24 horas inseridas em estufa bacteriológica, foram retiradas as placas e efetuada a contagem.

Figura 1 – Diluição seriada das amostras



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 2 – Placas CPP, contendo amostra de CBT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foi realizado a Contagem Bacteriana Total (CBT) manualmente em placas, também conhecida como Contagem Padrão em Placas (CPP) seguindo as normas

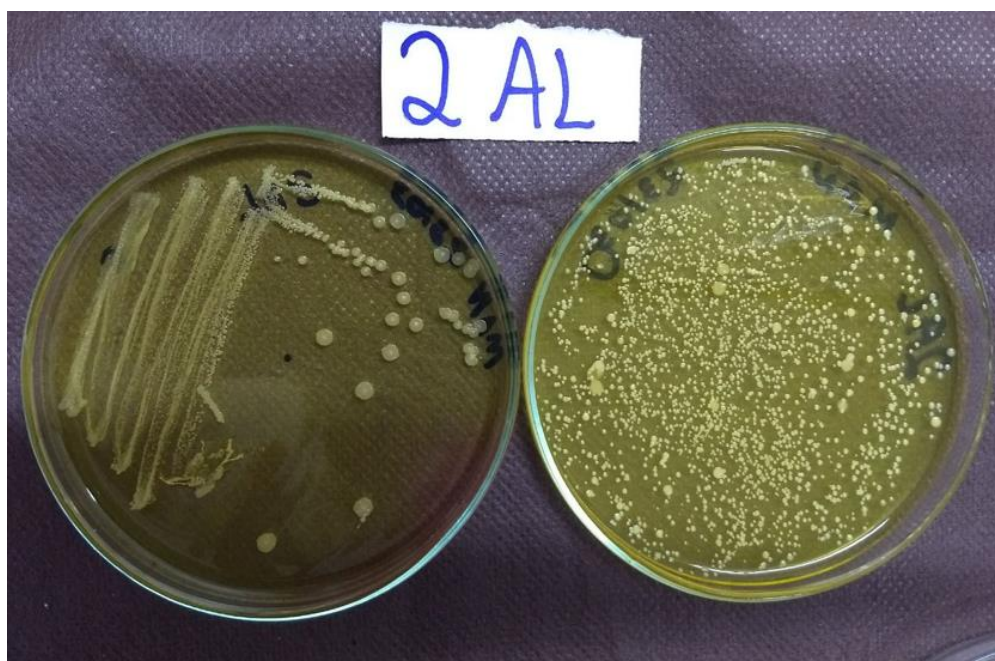
impostas pela Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) e Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002).

Após realizada a contagem, os dados foram inseridos em planilhas eletrônicas e por fim realizados os cálculos das UFC/ml das diluições antes da introdução e utilização dos antissépticos (tabela 1 e 2). Obtendo a contagem, foram isoladas em ágar manitol salgado amostras das bactérias presentes no leite e nos tetos (Figura 3) para realização do teste de sensibilidade dos antissépticos e aferição do halo de inibição dos mesmos para identificar o mais eficiente entre os antissépticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para aferição ação dos antissépticos e obtenção do halo de inibição, foi utilizado o isolado das bactérias realizado em meio de cultura Agar Manitol Salgado (Figura 3), a fim de que pudéssemos verificar a ação dos antissépticos na erradicação dos patógenos através do teste de sensibilidade pelo método disco-difusão aplicando a metodologia descrita pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST).

Figura 3 – Isolado de bactérias para teste de sensibilidade.

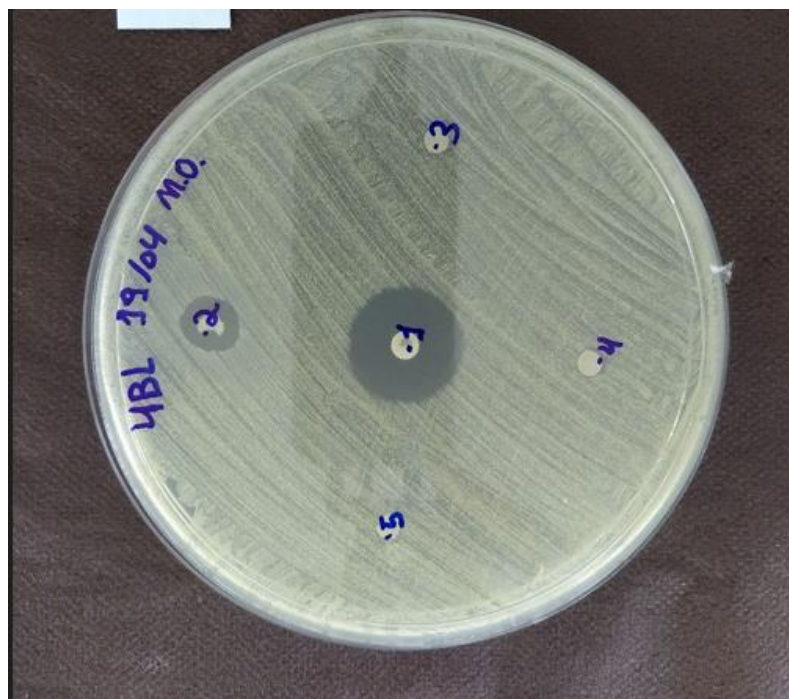


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Esses isolados foram replicados em placa de petri de poliestireno contendo Ágar Mueller-Hinton (figura 4) de forma que possibilitasse o crescimento do microrganismo por todo meio de cultura. Almejando a homogeneidade das amostras em consonância com o sucesso no isolamento de diversas colônias em diversas

placas, foram realizadas 18 repetições do teste de sensibilidade. Os tratamentos para o teste de sensibilidade foram um teste positivo (Vancomicina), um teste negativo (água destilada) e três testes com produtos comerciais a base de Iodo, Cloro e Clorexidina. Os discos foram organizados nas placas de petri em numerações sendo: nº1 – Teste Positivo; nº2 – Clorexidina; nº3 – Iodo; nº4 – Cloro; nº5 – Teste Negativo.

Figura 4 – Teste de sensibilidade Disco-Difusão.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Com o auxílio do software Sisvar, foram realizadas as avaliações estatísticas dos dados obtidos, através do teste Scott-Knott a um nível de probabilidade de 5%. Os resultados estatísticos presentes na Tabela 3, confirmam as duas hipóteses iniciais dos testes positivo e negativo, onde o melhor resultado foi obtido pela Vancomicina e o pior obtido pela Água.

Tabela 1 – Halos de inibição dos antissépticos comerciais (em mm)

Teste de Sensibilidade	
Antisséptico	Halo de inibição
Vancomicina	19,72 A
Clorexidina	14,13 B
Cloro	2,16 C
Iodo	2,05 C
Água	0,00 C

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V.: 37,84%. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Dentre os produtos comerciais, destacou-se o produto a base de Clorexidina que comprova, da mesma forma, SARTORI et. al (2012) que constataram a eficiência da Clorexidina quando comparado a outros antissépticos em teste de sensibilidade utilizando isolado de leite mastítico bovino. Os autores levantaram a afirmação de outro fator que coloca a clorexidina em destaque que é a não irritação da pele do teto, o que pode ser outro motivo para a tomada de decisão na escolha da clorexidina como antisséptico para uso *in vivo*.

E junto aos resultados de PEDRINE & MARGATHO (2003), que também constataram a ação antisséptica da clorexidina *in vitro* na erradicação de diversos microrganismos que causam tanto a mastite contagiosa, como a mastite ambiente, realizando teste de sensibilidade com diferentes concentrações.

Com os resultados das avaliações de CBT, obtidos também através de análise estatística pelo software Sisvar, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, pode-se confirmar que ambas as propriedades estavam passando por problemas sanitários devido a altas cargas microbiológicas patogênicas presentes no rebanho ordenhado. Em seguida das duas coletas iniciais onde os operadores da ordenha apenas foram informados sobre as medidas profiláticas, foi disponibilizado aos proprietários dos rebanhos o produto comercial cujo princípio ativo era a clorexidina, para que o mesmo pudesse utilizar nos animais do experimento junto com as medidas profiláticas, para assim pudéssemos realizar novas contagens de CBT após a introdução dos antissépticos nos períodos de 90 e 180 dias após a utilização do produto, para constatar a eficácia do manejo a campo.

Tabela 2 – Médias da CBT dos tetos da Propriedade “A”.**MÉDIAS DAS CBT'S PROPRIEDADE A (em UFC/ml)**

Animal	Amostras dos Tetos			
	Antes do uso do antisséptico		Após o uso do antisséptico	
	180 dias	90 dias	90 dias	180 dias
1	1.366.666,64 Bc	644.444,44 Bb	364.333,33 Ab	73.333,33 Aa
2	2.266.666,64 Ae	776.552,22 Ad	296.666,65 Bc	41.666,66 Ea
3	933.333,35 Dc	596.666,66 Cb	314.666,65 Ab	66.666,65 Ba
4	1.083.303,34 C	366.666,66 E	266.666,66 Cb	24.000,01 Fa
5	444.400,45 Fb	373.333,33 Db	137.777,76 Ea	64.333,33 Da
6	236.666,64 Hb	126.666,65 Ha	112.666,66 Ea	21.666,64 Ha
7	353.333,32 Gb	204.000,01 Gb	93.000,02 Ea	23.333,34 Ga
8	753.333,35 Ec	323.333,33 Fb	222.222,33 Db	66.666,64 Ca

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V.: 51,77%.
 Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 3 – Médias da CBT do leite da Propriedade “A”.

MÉDIAS DAS CBT'S PROPRIEDADE A (em UFC/ml)

Animal	Amostras de Leite			
	Antes do uso do antisséptico		Após o uso do antisséptico	
	180 dias	90 dias	90 dias	180 dias
1	331.302,34 Cb	355.333,33 Bb	235.333,34 Ca	144.442,23 Aa
2	230.000,02 Fc	293.333,34 Cd	155.333,34 Eb	77.477,55 Ea
3	800.111,13 Ab	623.666,65 Ac	256.666,64 Bb	66.271,14 Fa
4	361.000,02 Bd	281.033,33 Dc	103.333,34 Gb	53.333,33 Ga
5	21.666,65 Hb	34.666,65 Hc	26.666,64 Hb	14.666,66 Há
6	200.000,02 Gb	165.550,24 Gb	150.000,02 Fb	85.529,94 Da
7	266.666,65 Db	199.666,64 Fb	296.666,64 Ac	96.666,64 Ca
8	253.333,33 Eb	222.555,55 Eb	222.444,45 Db	102.020,05 Ba

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V.: 73,69%.
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Quando observadas as medias de CBT da propriedade que nomeamos como “Propriedade A”. As evidências que legitimam os dados foram observadas durante a realização da ordenha pelo operador, onde o mesmo não aplicava as medidas profiláticas corretamente durante a ordenha e nem possuía higiene pessoal. Estes fatores contribuíam para que houvesse elevada contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias, favorecendo a infecção e posterior inflamação dos alvéolos lácteos. A partir da adesão ao estudo e, compartilhamento das recomendações sobre as medidas profiláticas, pode-se observar as mudanças na higiene e conduta do operador da durante a ordenha, onde o mesmo passou a utilizar vestimenta mais adequada e cuidar da própria higiene. Estes fatores inicialmente já surtiram efeito positivo quando comparadas as medias de 180 e 90 dias antes da introdução do antisséptico, onde é possível observar nas Tabelas 2 e 3, que em alguns dos animais a CBT mostrou leve redução que, quando combinadas as medidas profiláticas surtiram resultados ainda melhores, atendendo as expectativas, visto que outros autores consultados haviam obtido resultados positivos quando combinados essas estratégias de combate a mastite.

Tabela 4 – Médias da CBT do teto da Propriedade “B”.

MÉDIAS DAS CBT'S PROPRIEDADE B (em UFC/ml)				
Amostras dos Tetos				
Animal	Antes do uso do antisséptico		Após o uso do antisséptico	
	180 dias	90 dias	90 dias	180 dias
1	853.333,34 Bc	623.333,34 Ab	70.000,02 Da	55.555,55 Da
2	630.055,01 Cb	510.000,02 Bb	72.666,64 Ca	59.635,53 Ca
3	933.333,34 Ac	500.000,02 Cb	66.666,65 Ea	45.455,54 Ga
4	416.666,64 Dc	261.111,13 Eb	53.333,35 Fa	49.998,95 Fa
5	346.666,65 Eb	363.333,35 Db	86.666,64 Aa	62.142,02 Ba
6	196.666,64 Fb	246.666,65 Fc	81.666,65 Ba	66.347,23 Aa
7	63.333,32 Ga	233.333,34 Gb	53.333,34 Ga	50.842,24 Ea

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V.: 35,24%.
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 5 – Médias da CBT do leite da Propriedade “B”.

MÉDIAS DAS CBT'S PROPRIEDADE B (em UFC/ml)				
Amostras de Leite				
Animal	Antes do uso do antisséptico		Após o uso do antisséptico	
	180 dias	90 dias	90 dias	180 dias
1	358.001,5 Cb	336.668,17 Cb	212.334,83 Ca	187.223,72 Ba
2	450.251,71 Bb	422.223,72 Bb	300.000,5 Aa	199.987,06 Aa
3	633.334,83 Ac	498.334,83 Ab	215.557,06 Ba	144.212,61 Da
4	295.788,73 Db	311.112,61 Db	178.546,95 Da	155.742,5 Ca
5	245.667,7 Eb	233.334,83 Eb	143.334,83 Fa	110.003,5 Fa
6	136.668,17 Fb	136.668,17 Gb	122.742,61 Ga	99.515,51 Ga
7	153.334,83 Gb	153.901,49 Fb	158.349,62 Ea	121.844,72 Ea

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V.: 63,12%.
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Assim como observado na propriedade “A”, os resultados da propriedade “B” também seguiram a mesma conclusão, onde inicialmente se encontrava altas cargas de microrganismo patogênicos tanto na superfície do teto quanto no leite obtido do rebanho, além da falta de higiene das instalações e operador. Quando introduzido as medidas profiláticas em consonância com o antisséptico comercial, foi possível obter resultados satisfatórios na redução da CBT do rebanho, isso reforça os resultados dos demais autores que já haviam estudado sobre a Clorexidina como PEDRINE &

MARGATHO (2003), que citam o efeito cumulativo e residual da clorexidina visto que quando comparado 90 dias após a introdução do produto e 180 dias a redução da carga patogênica é crescente.

O resultado do estudo foi exposto e explicado aos produtores, enfatizando a necessidade da implantação de medidas de higiene básica no momento da ordenha e que essas práticas iriam trazer redução significativa da contagem bacteriana total (GUERREIRO et. al. 2005). Os procedimentos abaixo descritos podem ser realizados de formas simples e sem grande investimento de capital, assim poderão ser adotados por pequenos produtores a fim de obterem resultados similares aos do projeto:

- Higiene pessoal do ordenhador: unhas aparadas, roupas e calçados limpos, mãos limpas.
- Limpeza dos equipamentos: pré enxágue de todos os equipamentos e lavagem manual vigorosa com detergente alcalino clorado e fibra adequada, enxágue e inversão dos latões e baldes.
- Higiene dos tetos: Com o teste de sensibilidade revelando que os melhores produtos antibacterianos são aqueles a base de clorexidina, sugerimos a realização os processos de pré-dipping e/ou pós dipping.

Confirmou-se a eficácia das novas medidas profiláticas adotadas, em conjunto com a utilização dos antissépticos, logo, o produtor pode replicar as novas práticas em todo o rebanho, mantendo a sanidade dos animais e conseqüentemente da qualidade do leite dentro do aceitável, que segundo as Instruções Normativas IN76 e IN77 do MAPA (2019), são de 300 mil UFC/ml nos resfriadores de cada propriedade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir a ação antisséptica positiva do produto comercial a base de clorexidina *in vitro* pelo teste de disco-difusão e *in vivo* pela aplicação prática do produto junto as medidas profiláticas no momento da ordenha, que resultou em redução da contagem de UFC/ml para a Contagem Bacteriana Total. Tais metodologias de adoção de medidas profiláticas e da utilização de antissépticos, podem ser replicadas em outras propriedades afim de também atingirem o êxito no controle microbiológico em seus rebanhos e produção.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C., SILVA, L. B. G. D., MEDEIROS, E. S., PINHEIRO-JÚNIOR, J. W., & MOTA, R. A. **Mastite em ruminantes no Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, p. 565, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 12 dez. 2011. Seção 1, p.9.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Gabinete Do Ministro. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DE 26 de novembro de 2018.

BRITO, J. R. F., CALDEIRA, G. A. V., VERNEQUE, R. da S., & Brito, M. A. V. P. e .. (1997). Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. Pesquisa Veterinária Brasileira, 17(2), 49–53. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000200002>

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C. de; MACHADO, T. F. **Salmonelose Associada ao Consumo de Leite e Produtos Lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

CRUZ, M. **Colorado do Oeste mostra o melhor do gado leiteiro no 10º ano de queda na produção**. 2022. Disponível em: <<https://www.gentedeopinioao.com.br/colunista/montezuma-cruz/colorado-do-oeste-mostra-o-melhor-do-gado-leiteiro-no-10o-ano-de-queda-na-producao>>. Acesso em: 06 de jul de 2023.

DELLA LIBERA, A. M. M. P., SOUZA, F. N. D., BLAGITZ, M. G., & BATISTA, C. F. **Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, p. 297-299, 2020.

EMATER-RO. **Bovinocultura de Leite**. Acesso em 28 de outubro de 2023. Disponível em: <<http://www.emater.ro.gov.br/ematerro/bovinocultura-de-leite/>>.

FILGUEIRAS, E.A., **CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E SUA RELAÇÃO COM A PRODUÇÃO E A QUALIDADE DO LEITE E DERIVADOS**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL. Disponível em: <https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011_Evando_Alves_2c.pdf>.

FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, p. 314, 2000.

GUERREIRO, P. K. et al. **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITE EM FUNÇÃO DE TÉCNICAS PROFILÁTICAS NO MANEJO DE PRODUÇÃO**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005

HAXHIAJ, K. WISHART, D. S. AMETAJ, B. N. **Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers**. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/dairy3040050>>. Acesso em 06 de Fevereiro de 2024.

IDARON. **Relatório de Gestão**. Porto Velho – RO, Ed Suplementar 70.1, v. 1, p. 63, 2023.

IDARON. **Dados Agropecuários**. Acesso em 28 de outubro de 2023. Disponível em: <<http://www.idaron.ro.gov.br/index.php/relatorios-e-formularios/>>.

NERO, L. A., MAZIERO, D., BEZERRA, M. M. S. **Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão - PR**. Semina: Ciências Agrárias, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

SARTORI, L.C.A., SANTOS, R.C., MARIN, J.M. **AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES COMERCIAIS UTILIZADOS NO PRÉ E PÓS DIPING FRENTE À *Candida* spp ISOLADA DE LEITE MASTITICO BOVINO**. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, v.28, n.4, 240-243, 2012

PALMA. G.B, **PADRÃO DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM BUBALINOS: REVISÃO DA LITERATURA**. Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC. Disponível em: <https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/565/1/Guilherme%20Batista%20Palma_0002235.pdf>.

PEDRINI, S. C. B., MARGATHO, L. F. F. **Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 70, n. 4, p.391-395, out. 2003.

WHITEHEAD, J., & LAKE, B. **Recent trends in unpasteurized fluid milk outbreaks, legalization, and consumption in the United States**. PLoS Currents, 10. 2018.

RELATÓRIO DE VERIFICAÇÃO DE PLÁGIO

DISCENTE: RAFAEL BATISTA DE LIMA OLIVEIRA

CURSO: Agronomia

DATA DE ANÁLISE: 05.02.2024

RESULTADO DA ANÁLISE

Estatísticas

Suspeitas na Internet: **3,76%**

Percentual do texto com expressões localizadas na internet [▲](#)

Suspeitas confirmadas: **3,41%**

Confirmada existência dos trechos suspeitos nos endereços encontrados [▲](#)

Texto analisado: **92%**

Percentual do texto efetivamente analisado (frases curtas, caracteres especiais, texto quebrado não são analisados).

Sucesso da análise: **100%**

Percentual das pesquisas com sucesso, indica a qualidade da análise, quanto maior, melhor.

Analisado por Plagius - Detector de Plágio 2.8.5
segunda-feira, 05 de fevereiro de 2024

PARECER FINAL

Declaro para devidos fins, que o trabalho do discente RAFAEL BATISTA DE LIMA OLIVEIRA n. de matrícula **53929**, do curso de Agronomia, foi aprovado na verificação de plágio, com porcentagem conferida em 3,76%. Devendo o aluno realizar as correções necessárias.

Assinado digitalmente por: ISABELLE DA SILVA SOUZA
Razão: Faculdade de Educação e Meio Ambiente -
FAEMA

ISABELLE DA SILVA SOUZA
Bibliotecária CRB 1148/11

Biblioteca Central Júlio Bordignon
Centro Universitário Faema – UNIFAEMA