

**JOÃO MARIA HOMEM DE CARVALHO VAILLANT**

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL EFICÁCIA DO  
DESINFECTANTE “HYPRED FORCE 7®” EM  
DIFERENTES TIPOS DE CAMA DE BOVINOS LEITEIROS**

**Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2021**

**JOÃO MARIA HOMEM DE CARVALHO VAILLANT**

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL EFICÁCIA DO  
DESINFECTANTE “HYPRED FORCE 7®” EM  
DIFERENTES TIPOS DE CAMA DE BOVINOS LEITEIROS**

Dissertação defendida em provas publicas a para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 29/07/2021, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação Nº 238/2021, de 15 de Julho de 2021, com a seguinte composição:

**Presidente: Professor Doutor Eduardo Marcelino**

**Arguente: Professora Doutora Sofia Van Harten**

**Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2021**

## **Epígrafe**

**Escuto e esqueço; vejo e recordo; faço e entendo**

**Tao Te King**

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar, ao meu pai Gil Daniel Vaillant pela oportunidade proporcionada e por me apoiar sempre, desde o primeiro dia deste percurso académico e profissional, partilhando entusiasmo e conhecimentos sempre que possível, e motivando-me a tentar ir sempre um pouco mais além.

Não podia deixar de agradecer também à minha mãe Maria de Fátima Homem, por todo o apoio prestado ao longo da vida, pelos valores que me transmitiu, que sem dúvida foram uma das bases para a realização do curso, assim como por tolerar as minhas crises existenciais ao longo deste percurso.

À minha família, aos que já partiram e aos que ainda hoje me acompanham, por todas as experiências e ensinamentos de vida partilhados, em especial à constante alegria e juventude da minha avó Bebé.

Ao eterno amigo e “pai adotivo” Paulo Morais, pelo apoio emocional, pela insistência e persistência, pela dedicação e empenho, pelo seu espírito de sacrifício e entreaajuda que garantidamente foram bases que me facilitaram a realização desta dissertação, e que me irão acompanhar o resto da vida.

Ao Professor Dr. João Cannas da Silva pelo excelente estágio proporcionado (juntamente com a sua equipa), assim como pela orientação desta dissertação. Por todo o apoio dado e por me ter aberto os seus braços, tornando-se muito mais do que um amigo. Sem dúvida, para além de um excelente professor e médico veterinário, é uma excelente pessoa, com uma amabilidade e disponibilidade constantes. Obrigado por todos os conhecimentos partilhados, pela amizade e pelo carinho.

Ao Dr. João Carçoço, pelas viagens e almoçadas ao longo das nossas jornadas de trabalho, assim como por todo o conhecimento partilhado.

Ao Dr. Carlos Silva, pela minha inclusão na sua equipa de trabalho, abrindo-me não só as portas das explorações a que dá apoio, como as portas de sua casa.

À Ana Matos, pelo apoio no tratamento e análise de dados estatísticos desta dissertação.

À Ana Rocha, por me ter salvo de mim próprio, por me ter aberto horizontes estimulando e criando objetivos que me permitiram e incentivaram a acabar esta dissertação, assim como por toda a ajuda na correção da mesma. Adoro-te loirinha.

A todos os proprietários das explorações onde se desenrolou o meu estágio e onde foi realizado este estudo.

Aos meus colegas de faculdade, em especial a Teresa Almeida, ao Pedro Lopes, à Mariana Ricci, com quem partilhei inúmeros momentos e trabalhei durante estes 6 longos anos, mas também ao Miguel Esteves, à Gabriela Cabral, à Maria Sara Santos, ao Pedro Caseiro, e todos os restantes colegas que caminharam ao meu lado durante este curso.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos de infância, sobretudo ao Carlos Barriguinha, ao Ângelo Castelinho, ao Ângelo Chambel, ao Renato Matias, e a todos os outros que partilharam comigo momentos de descontração, diversão e apoio.

Obrigado

## Resumo

A mastite é uma patologia da glândula mamária, caracterizada por uma inflamação do úbere das vacas, com alteração ou não do estado geral do animal, assim como do leite produzido.

A grande maioria das mastites propaga-se e/ou deve-se a erros de manejo (iatrogénicos), manutenção, higiene e conceção das explorações, como por exemplo, erros na escolha do tipo de material a utilizar nas camas, sobrelotação animal, má técnica de ordenha, assim como a outros fatores como a incorreta afinação e manutenção das máquinas de ordenha.

Sendo esta uma das patologias com maior impacto a nível mundial nas explorações de bovinos de leite, devido à desvalorização comercial do mesmo, aos custos associados ao seu tratamento, e à perda de animais para refugo precoce. Foi objetivo desta dissertação, testar um desinfetante (Hypred Force 7®) como redutor do número de microorganismos patogénicos presentes nas camas das vacas leiteiras, enquanto agentes de mastites.

Para tal foi realizada a desinfeção total das camas de uma exploração com três tipos de substrato (areia, borracha e orgânica), e foram colhidas amostras, por técnica de esfregaço de contacto, antes e vários tempos após a desinfeção das mesmas. Estas foram enviadas para análise laboratorial para contagem dos microorganismos totais (microorganismos a 30°, coliformes e *Escherichia coli*).

Como resultado, verificou-se que o desinfetante testado não se revelou eficaz, em explorações onde não esteja previsto um vazio sanitário, e que as camas de areia, apresentam-se como o melhor tipo de substrato a utilizar tanto em termos de bem-estar animal, como em termos de higiene.

**Palavras-chave:** Desinfetante; Hypred Force 7; Sensibilidade; Vacas leiteiras; Eficácia; Contagens

## Abstract

Mastitis is a pathology of the mammary gland, defined by an inflammation of the udder of the cow with changes, or not, in the general condition of the animal and in the produced milk.

This pathology mainly occurs due to management errors (iatrogenic), maintenance, hygiene and farm designs. These include the type of material for bedding, animal overcrowding, bad milking technique, incorrect tuning and maintenance of milking machines.

This is one of the pathologies with the biggest worldwide impact on dairy cattle farms due to its commercial devaluation, the costs associated with its treatment, and the loss of animals for early refuse.

The aim of this dissertation was to test the efficacy of the disinfectant “Hypred Force 7®”, in order to reduce the number of pathogenic microorganisms present in bedding of dairy cows - as mastitis agents.

For this purpose, the total disinfection of the beds of a farm with three types of substrate (sand, rubber and organic) was performed. Samples were taken by contact smear technique, before and at various times after disinfection and then sent for laboratory analysis for total microorganisms count (microorganisms at 30°, coliforms and *Escherichia coli*).

As a result, it was concluded that the disinfectant used for this study was not effective in farms where a void is not foreseen. In addition, there was also determined that sand beds are the best type of substrate to use, for the benefit of both animal welfare and hygiene.

**Keywords:** Disinfectant; Hypred Force 7; Sensitivity; Dairy cows; Efficacy; counts

### Lista de Abreviaturas

<b>CA</b>	Cama de areia
<b>CB</b>	Cama de Borracha
<b>CCS</b>	Contagem de células somáticas
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetro cúbico
<b>CO</b>	Cama Orgânica
<b>DAD</b>	Deslocamento do abomaso à direita
<b>DAE</b>	Deslocamento do abomaso à esquerda
<b>DIV</b>	Direcção de Intervenção Veterinária
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Et al.</b>	E outros
<b>GnRH</b>	Hormona Libertadora da Gonadotrofina
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>l</b>	Litros
<b>LR</b>	Lactato de Ringer
<b>m<sup>2</sup></b>	Metro quadrado
<b>mm</b>	Milímetros
<b>NaCl</b>	Soro fisiológico com cloreto de sódio
<b>OFC</b>	“On Farm Culture®”
<b>OPP / ADS</b>	Organização de produtores de Pecuária / Agrupamento de Defesa Sanitária
<b>SADR</b>	Sem alterações dignas de registo
<b>Staph.</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Strep.</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>Strep. uberis</b>	<i>Streptococcus uberis</i>
<b>TCM</b>	Teste Californiano de Mastites
<b>TSA</b>	Teste de Sensibilidade a antibióticos

## Índice Geral

Índice de tabelas.....	11
Índice de gráficos.....	13
1. Natureza e Enquadramento do estágio .....	14
2. Introdução .....	20
2.1. Caracterização das mastites .....	21
2.2. Mastites contagiosas.....	23
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
2.2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	24
2.2.3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....	25
2.3. Mastites ambientais.....	26
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.3.2. <i>Streptococcus uberis</i> .....	27
2.3.3. <i>Staphylococcus Coagulase Negativa (SCN)</i> .....	28
2.4. Diagnóstico .....	29
2.4.1. “Fotosomatic” .....	30
2.4.2. Teste Californiano de Mastites – TCM.....	31
2.4.3. Condutividade elétrica.....	33
2.4.4. “OneFarmCulture®” .....	34
2.5. Tratamento.....	36
2.6. Prevenção e Maneio .....	45
2.6.1. Tipos de Parque.....	45
2.6.2. Tipos de Cama.....	46
2.6.2.1. Camas orgânicas .....	47
2.6.2.1.1. Camas de Palha .....	47
2.6.2.1.2. Serradura, serrim e aparas de madeira .....	47
2.6.2.1.3. Camas de compostos ou orgânicas.....	47
2.6.2.1.4. Materiais de cama à base de papel .....	48
2.6.2.2. Camas inorgânicas .....	48
2.6.2.2.1. Camas de areia .....	48
2.6.2.2.2. Camas de Borracha.....	49
2.7. Objetivos .....	52
3. Material e Métodos.....	53

3.1. Materiais .....	53
3.1.1. Caracterização do desinfetante – Hypred Force 7® .....	53
3.1.2. Caracterização da exploração.....	53
3.2. Metodologia de trabalho.....	57
3.2.1. Teste de sensibilidade.....	57
3.2.2. Teste de método de amostragem e análise.....	57
3.2.3. Desinfecção e recolha de amostras .....	58
3.2.4. Metodologia de pesquisa ao nível Laboratorial.....	59
4. Resultados .....	61
4.1. Teste de sensibilidade.....	61
4.2. Avaliação da eficácia do desinfetante.....	62
5. Discussão e Conclusão .....	64
5.1. Discussão .....	64
5.2. Conclusão .....	66
6. Bibliografia .....	67
7. Anexos .....	71
Anexo I – Triptico “One Farm Culture” by Zoetis .....	I
Anexo II – Flyer “Hypred Force 7®” by Kersya.....	VII
Anexo III –Bula “Hypred Force 7” .....	VIII
Anexo IV – Bula “Diluyente salino de peptona” .....	XII
Anexo V- Resultados teste de método de recolha e tipo de análises a realizar.....	XIII
Anexo VI – Marca e manual de utilização do pulverizador .....	XIX
Anexo VII – Método de pesquisa laboratorial de <i>E. coli</i> e Coliformes.....	XX
Anexo VIII - Método de pesquisa laboratorial de Microorganismos a 30°C .....	XXIV
Anexo IX – Resultados das Análises Camas de Areia realizadas pelo LMV .....	XXXVII
Anexo X – Resultados das Análises Camas Orgânicas realizadas pelo LMV .....	XLII
Anexo XI – Resultados das Análises Camas de Borracha realizadas pelo LMV ....	XLVII

## Índice de tabelas

Tabela 1: Mastites contagiosas e ambientais.....	22
Tabela 2- Reacção do TCM e equivalências com as CCS .....	32
Tabela 3 - Divisão de antibióticos segundo classes .....	39
Tabela 4 - Opções de AINE a utilizar no tratamento de mastites .....	43
Tabela 5 - Divisão dos diversos parques da exploração consoante o tipo de estabulação. .....	54
Tabela 6 - Divisão dos diversos parques da exploração consoante o tipo de cama utilizado. .....	54
Tabela 7 - Resultados da observação de alterações ao nível da glândula mamária e superfícies em contacto com as camas. ....	61

## Índice de Figuras

Imagem 1 – Exemplos de teste TCM .....	31
Imagem 2 - Interpretação de teste "OFC" positivo para <i>Streptococcus spp</i> .....	34
Imagem 3 - Interpretação de teste "OFC" positivo para <i>Staphylococcus spp</i> , sendo na terceira imagem possível ainda identificar um cultura positiva para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
Imagem 4 - Interpretação de teste "OFC" positivo para Coliformes .....	35
Imagem 5 - Interpretação de teste "OFC" Negativo .....	35
Imagem 6 - Exemplo de um tapete de borracha coberto com substrato de areia.....	50
Imagem 7 - Exemplo de um tapete de borracha. ....	51
Imagem 8 - Exemplo de um tapete de borracha - Superfície inferior.....	51
Imagem 9 - Parque com camas de areia em estilo "lojete"(cubículo) .....	55
Imagem 10 - Parque com camas de borracha em estilo "lojete"(cubículo). ....	55
Imagem 11 - Parque com camas orgânicas em estilo livre .....	56

## Índice de gráficos

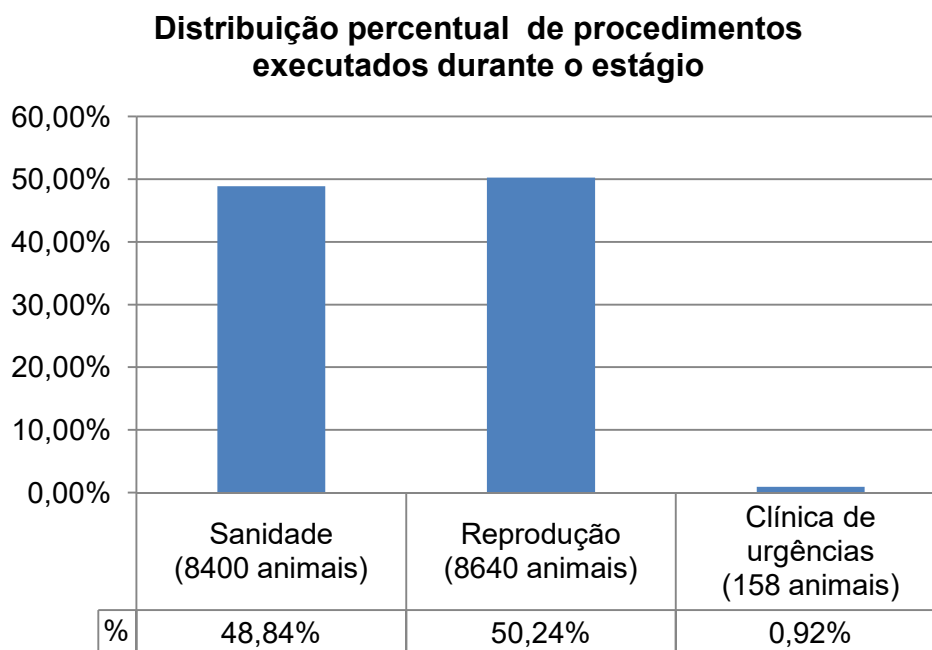
Gráfico 1: Distribuição em percentagem das actividades executadas durante o estágio.	14
Gráfico 2: Distribuição em percentagem das actividades executadas em Clínica de urgências durante o estágio. ....	15
Gráfico 3: Distribuição em percentagem das actividades sanitárias por espécie animal	17
Gráfico 4: Distribuição em percentagem das diversas cirurgias realizadas durante o período de estágio. ....	19
Gráfico 5 - Taxas percentuais de cura após tratamento, para mastites subclínicas causadas pelos microorganismos mais comuns. ....	37
Gráfico 6: Gráfico comparativo da quantidade de microorganismos presentes nos diversos tipos de cama .....	49
Gráfico 7- Teste de sensibilidade ao Principio Activo, Resultados das médias de lactação nas 2 ordenhas seguintes. ....	61
Gráfico 8 - Comparativo das contagens de Coliformes nos três tipos de cama estudados .....	62
Gráfico 9 - Comparativo das contagens de E.coli nos três tipos de cama estudados..	63
Gráfico 10 - Comparativo das contagens de Microorganismos a 30°C nos três tipos de cama estudados .....	63

## 1. Natureza e Enquadramento do estágio

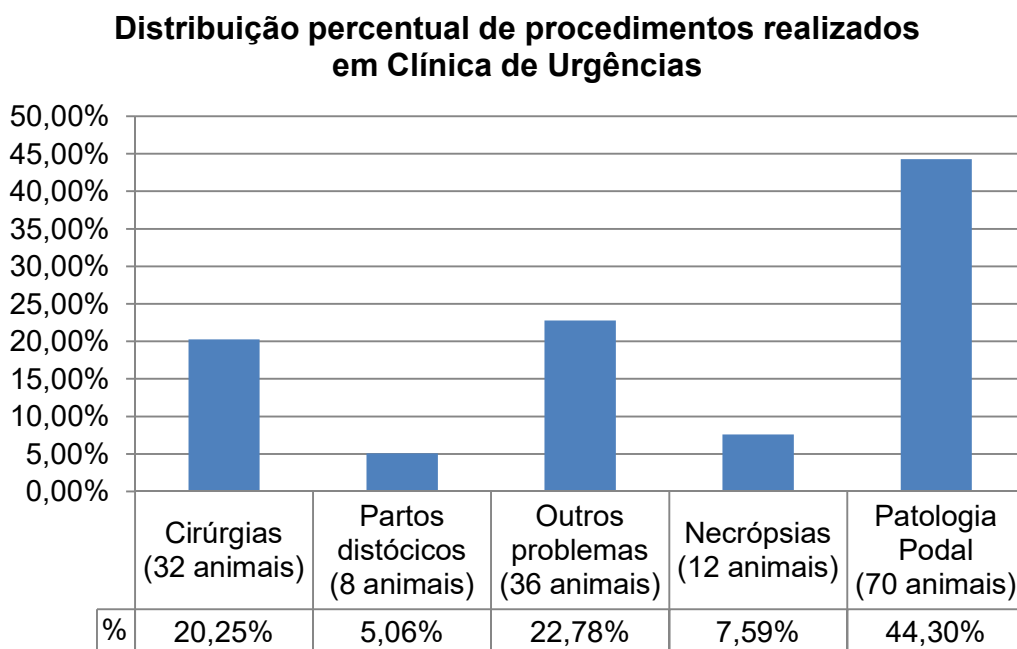
O estágio curricular decorreu durante 6 meses (entre o período de 1 de Fevereiro de 2018 a 1 de Agosto de 2018), e consistiu em acompanhar o Prof. Dr. João Cannas da Silva, Dr. João Caroço e o Dr. Carlos Silva no seu dia-a-dia enquanto médicos veterinários e consultores de diversas explorações pecuárias. Os três veterinários acima citados, prestam serviços de apoio à reprodução e sanidade, assim como assistência médica ou veterinária em regime de ambulatório nas zonas de Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo.

Além das funções designadas anteriormente, o Dr. João Caroço e o Dr. Carlos Silva são responsáveis pelo Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) de Sobral de Monte Agraço.

Abaixo, encontra-se representado nos gráficos 1 e 2, a distribuição de intervenções executadas e/ou com as quais tive contacto durante o estágio.



**Gráfico 1:** Distribuição em percentagem das actividades executadas durante o estágio.



**Gráfico 2:** Distribuição em percentagem das actividades executadas em Clínica de urgências durante o estágio.

Durante o estágio, por rotina, em sistema ambulatorio foram visitadas quinze explorações de vacas de leite (semanal ou quinzenalmente) às quais era dada assistência reprodutiva. Esta englobava: 1) os diagnósticos de gestação a partir dos 30 dias após inseminação artificial ou monta natural; 2) a confirmação da gestação aos 60 dias e aos 120 dias; 3) e a confirmação para secagem das vacas e preparação do parto 60 dias antes. Nestas explorações era também efetuado o controlo reprodutivo após o parto, verificando-se a correta recuperação dos animais e a involução uterina, diagnosticando-se alterações uterinas pós-parto como por exemplo: metrites, endometrites, aderências, ou existência de problemas vários (como quistos de teca-folicular, corpos lúteos persistentes, entre outros) que colocam em causa a produtividade e o próximo ciclo reprodutivo. Era ainda efetuada a sincronização e preparação de vacas para posterior inseminação artificial, com base nos programas de sincronização mais conhecidos como o “Ovsynch”, no qual é administrada ao dia 0 uma injeção hormonal intramuscular (IM) de Hormona Libertadora da Gonadotrofina (GnRH) que estimula o inicio de uma nova onda folicular, e 7 dias depois é administrada uma prostaglandina para indução do cio, e ao 9º dia é administrada novamente GnRH que induz a ovulação, pelo que a inseminação é efetuada 16 horas após este último procedimento.

Na generalidade as explorações de vacas leiteiras, possui programas informáticos de gestão reprodutiva, o que facilita o trabalho do médico veterinário em virtude de poderem ser separados os animais a examinar por tempo ante-parto e pós-parto (idealmente, 30 dias após inseminação artificial ou cobrição por monta natural, é executado o diagnóstico de gestação). O programa de controlo reprodutivo aplicado em estágio foi executado da seguinte forma: 1) exame dos animais recém-paridos ao 10º dia, 21º ou 23º dia pós-parto para avaliar o estado do tracto reprodutivo; 2) acompanhamento dos animais com patologia reprodutiva ao nível do útero ou dos ovários (metrites, endometrites, quistos, aderências, e outras alterações).

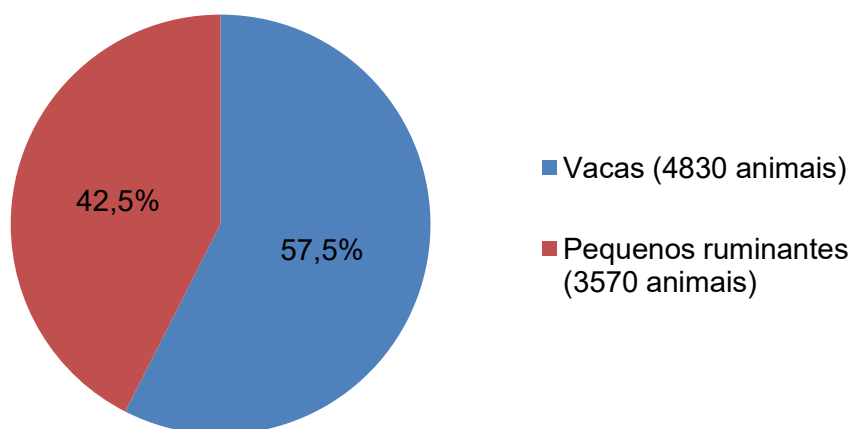
No âmbito da sanidade e atuação ao serviço da ADS ou da Organização de Produtores Pecuários (OPP) de Sobral de Monte Agraço foram efetuados despistes de brucelose e tuberculose em vacas (doenças de declaração obrigatória). Para pesquisa de brucelose foram efetuadas colheitas de sangue e/ou de leite (diferença justificada pelas normas emanadas pela Direcção de Intervenção Veterinária [DIV] a que reporta a referida OPP). A título de exemplo, em vacas secas, é colhido sangue para o referido teste. Já em vacas em produção, o teste dependerá das indicações da DIV. De acordo com a supracitada entidade, o teste através do leite deve ser realizado numa amostra proveniente de 200 animais (no máximo) e efetuado 2 vezes por ano.

Já os testes de tuberculose, foram executados pela prova de intradermotuberculização comparada, obrigatórios para bovinos uma vez por ano nesta OPP, conforme indicação da DIV da zona do Ribatejo e Oeste, assim como é obrigatório executar testes de pré movimentação para deslocação de animais para outras explorações fora da DIV.

Ainda no âmbito da sanidade, no que concerne aos pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) efetuou-se a identificação dos animais dos efectivos com brinco auricular e chip intra-ruminal, e a colheita de sangue para pesquisa de brucelose assim como a vacinação contra a Língua Azul, o que está novamente dependente das indicações da DIV regional.

A distribuição de animais ao qual se executaram procedimentos relativamente ao controlo obrigatório da sanidade encontra-se representada no gráfico 3.

### Distribuição percentual de sanidades por espécie animal



**Gráfico 3:** Distribuição em percentagem das actividades sanitárias por espécie animal

Em clínica médica de urgência de bovinos, em regime de ambulatório, fez-se o diagnóstico, tratamento e profilaxia de diversas doenças dos vários sistemas.

O sistema reprodutor registou a maior ocorrência de casos clínicos, permitindo assim assistir a diversos partos distócicos que foram tratados quer por abordagem manual, quer cirúrgica, por cesariana ou fetotomia. Executou-se ainda, a resolução de prolapsos uterinos, tratamento de retenções placentárias, metrites e endometrites puerperais. Foi realizado igualmente o diagnóstico de diversas situações de animais em anestro, provocadas por: 1) persistência de corpo lúteo (tratamento com administração de prostaglandinas); 2) quistos foliculares (tratamento com administração de GnRH); 3) ovários disfuncionais, na sua maioria consequentes de erros alimentares, como carências vitamínicas ou balanços energéticos negativos, cuja correção implica alterações na dieta, suplementação vitamínica e maneio com particular atenção ao período seco, pré e pós-parto.

Quanto ao sistema gastrointestinal, foram diagnosticadas 12 deslocações de abomaso, o que permitiu acompanhar a sua resolução cirúrgica quer por técnica aberta à esquerda (DAE) – Método de Utrecht em 5 casos, quer por técnica aberta à direita (DAD) – Método de Hannover num único caso (com a realização de uma omentopéxia). Nos restantes casos de DAE foi efetuada a fixação externa pelo Método de Sterner-Grimmer ou Toogle-pin, apenas possível quando à auscultação com percussão se identificasse grande quantidade de gás no abomaso.

Fez-se igualmente o acompanhamento de diversas situações de enterite, muitas de origem desconhecida e diarreias neonatais, ambas provocadas na sua grande maioria por *E. coli*, Rotavírus, Coronavírus e *Criptosporidium spp.* Uma errada administração de colostro ou pobres em imunoglobulinas, uma dieta alimentar deficiente, bem como a utilização de leites de substituição de má qualidade e/ou a temperatura incorreta, assim como camas sujas e húmidas, são igualmente causas de relevância em diarreias neonatais.

Foram aplicados planos de profilaxia e prevenção de cetose bovina com a administração de bolos ruminais (kexxtone®) sendo tratados apenas 3 casos de cetose.

Em relação ao sistema cardiovascular, foi observado somente um caso de endocardite valvular de etiologia desconhecida da válvula pulmonar e tricúspide, apresentando a vaca um pulso jugular marcado, auscultação cardíaca compatível, e presença de ascite.

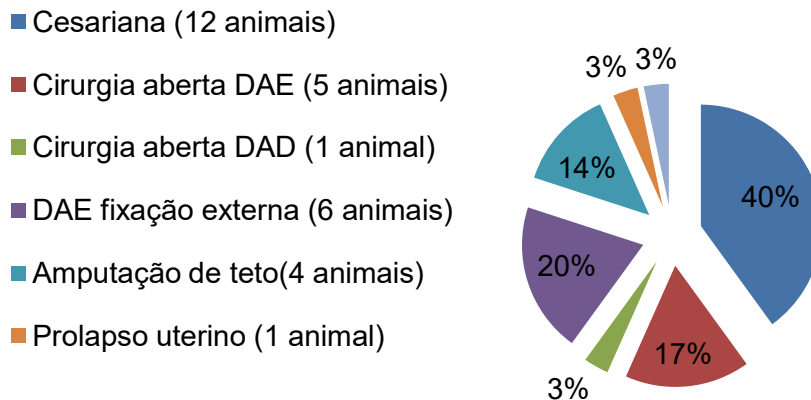
Respeitante ao sistema locomotor, foram diagnosticadas diversas patologias podais bovinas que implicaram corretagem terapêutica e profilática de cascos, tratamento de diversas dermatites interdigitais, digitais, doenças da linha branca, abscessos podais, tilomas, diversos tipos de fissuras, coriites (antiga denominação Laminites), úlceras da sola (provocadas por má conformação da mesma ou ausência de corretagem profilática) e lesões provocadas por excesso de erosão da sola.

Ao nível da glândula mamária foram diagnosticadas diversas mastites, com 4 casos de amputação dos tetos afetados, sendo estes animais separados do restante efectivo para evitar o contágio.

Foi ainda possível acompanhar um caso clínico de intoxicação por micotoxinas que afetou toda uma exploração, levando a patologias do foro intestinal e reprodutor. Foi também observado o caso de uma vaca com peritonite, que desencadeou posteriormente falência multiorgânica, conduzindo à morte. Por último, faz-se referência a um caso isolado de leptospirose, provocada por silagem mal acondicionada.

Todas estas situações estão representadas no gráfico 4.

### Distribuição percentual das cirurgias realizadas durante o estágio



**Gráfico 4:** Distribuição em percentagem das diversas cirurgias realizadas durante o período de estágio.

## 2. Introdução

O aumento da população mundial, juntamente com a incapacidade de produção de alimentos que consigam fazer face às necessidades mundiais, estimulou a procura por parte dos consumidores de alimentos mais económicos, seguros e de alta qualidade, como por exemplo os produtos lácteos (W K Fulwider *et al.*, 2013), estimulando assim os mercados a procurarem formas de incentivar os produtores a produzir leite de qualidade. Para tal foram criados prémios, ou seja, um valor acrescentado aos produtores com elevados padrões de qualidade, com base na contagem de células somáticas (CCS) do leite (Schukken, Ilson, Elcome, Ikofsky, & Onzalez, 2003; Rowbotham & Ruegg, 2016). Esta medida obrigou à reestruturação e adaptação das explorações interferindo diretamente no aumento de produtividade, melhoria do bem-estar animal, e por consequência numa redução dos problemas normalmente associados a explorações intensivas de leite, nomeadamente numa redução do número de mastites, e num consequente aumento das receitas e lucros das explorações (Bickert & Radostits, 2000; Schukken *et al.*, 2003)

As mastites bovinas são consideradas uma das principais doenças das explorações leiteiras em todo o mundo, afectando uma elevada percentagem dos efectivos, sendo por isso uma das maiores causas de perdas económicas na indústria leiteira (Huijps, Lam, & Hogeveen, 2008; Riekerink, Barkema, Kelton, & Scholl, 2008; Lam *et al.*, 2013).

O termo mastite deriva do grego “*mastos*” úbere, e “*itis*” inflamação. Esta tradução e interpretação permite-nos pressupor que uma mastite é uma reacção inflamatória dos tecidos secretores ou condutores do leite na glândula mamária, como resposta a uma infecção maioritariamente bacteriana ou lesão traumática (Saran & Chaffer, 2000).

Esta reacção inflamatória desencadeia-se com o objetivo de eliminar ou neutralizar os microorganismos invasores e promover a reparação dos tecidos lesados, restabelecendo assim a função normal da glândula mamária.

## 2.1. Caracterização das mastites

A maioria das mastites é reconhecida pelos produtores, quando estes conseguem identificar alterações em pelo menos um quarto e ou inflamação úbere, associado a variações na aparência do leite. Sendo consideradas mastites clínicas, quando apresentam sinais e sintomas observáveis como edema dos quartos, calor, rubor ou dor ao contacto, e com uma secreção anormal identificada por alterações macroscópicas do leite, que pode apresentar um aspecto aguado ou cheio de grumos ou flóculos (Blowey & Edmondson, 2010).

No entanto, estas também podem ser consideradas subclínicas, nas quais existe uma infecção do úbere, não sendo observáveis alterações macroscópicas, sinais clínicos ou outros sintomas que permitam o seu reconhecimento (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010), o que implica que estas sejam apenas identificáveis pela contagem individual de células somáticas no leite, que irá apresentar sempre valores acima das 200.000 células somáticas por mililitro ou pelo teste californiano de mastites (TCM), descrito mais abaixo (Blowey & Edmondson, 2010). No entanto em Portugal, o Regulamento CE nº 853/2004, SECÇÃO IX, Anexo III aprovada pelo Decreto-Lei n.º 223/2008, permite a venda e recolha de leite cru com CCS até às 400 000 células somáticas, numa média geométrica constatada ao longo de um período de três meses, com pelo menos uma colheita mensal. Ainda assim, e como forma de controlo e incentivo à aplicação de boas técnicas de manejo e de bem-estar animal, as entidades responsáveis pela recolha do leite penalizam produtores que tenham leite com valores de CCS acima das 300 000 células somáticas.

A severidade da mastite clínica pode variar entre aguda a hiperaguda. As mesmas apresentam sintomatologia sistémica como hipertermia, desidratação, anorexia e desconforto. Nalguns casos a severidade é tal, que pode levar à morte do animal, desencadeando-se assim uma mastite tóxica, normalmente de curta duração, contrariamente às mastites subclínicas que são prolongadas ou crónicas, permanecendo os animais assintomáticos (Saran & Chaffer, 2000).

Para além desta classificação das mastites, estas também podem e devem ser caracterizadas tendo em conta o tipo de infecção, podendo ser divididas em mastites contagiosas ou mastites ambientais. São classificadas consoante o microrganismo presente, a fonte de infecção do mesmo, o momento de transmissão e de infecção, tal como demonstrado na tabela 1 (Cannas da Silva, van Harten, & Roque, 2017). Esta classificação permitirá o estabelecimento de medidas profiláticas, sanitárias e preventivas mais eficazes.

**Tabela 1:** Mastites contagiosas e ambientais - Adaptado de (Cannas da Silva *et al.*, 2017)

	Contagiosas	Ambientais
<b>Bactéria</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNC – <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Mycoplasma</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Citrobacter</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pasteurella</i> <i>Streptococcus faecalis</i> Fungos Leveduras
<b>Fonte de infecção</b>	Úbere	Ambiente
<b>Momento de transmissão</b>	Ordenha	Período Seco Entre ordenhas
<b>Momento de infecção</b>	Lactação	Lactação Período Seco

As mastites contagiosas têm como reservatório da infecção o úbere e os tetos, e estas desenvolvem-se no teto e no seu canal, sendo a transmissão feita sobretudo durante a ordenha, por deficiências na preparação do úbere ou na manutenção e desinfecção do sistema de ordenha (Cannas da Silva *et al.*, 2017). A maioria destas infecções apresenta-se na forma subclínica, resultando assim única e exclusivamente no aumento da CCS. As medidas de controlo essenciais são a correta desinfecção dos tetos antes e após a ordenha (pré e pós-*dipping*) e refugo de animais com mastites crónicas. As bactérias mais frequentemente isoladas neste tipo de mastite incluem: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus dysgalactiae* (Blowey & Edmondson, 2010).

Nas mastites ambientais, o ambiente é o principal reservatório destas infecções, sendo a transmissão feita essencialmente entre ordenhas, pela falta de manutenção e higiene dos parques e camas dos animais ou por falhas na higienização do úbere (Cannas da Silva *et al.*, 2017). Normalmente, as mastites ambientais são causadas por infecções oportunistas que se aproveitam de uma baixa na imunidade da vaca para se estabelecer na glândula mamária (Schukken, Tikofsky, & Zadoks, 2005). Os microorganismos sobem pelo canal do teto durante a ordenha ou em vacas que se deitem logo após a ordenha, por maneiio errado das explorações quando não é disponibilizada comida fresca nas manjedouras. A maioria destas infecções manifesta-se como uma mastite clínica, podendo

raramente surgir na forma subclínica. O seu controlo passa essencialmente por um bom maneio da exploração, mantendo o ambiente e os parques limpos, com camas adequadas e limpas, uma correta higienização do úbere, desinfeção *pré-dipping* e *pós-dipping*, manutenção e correto funcionamento das máquinas de ordenha, assim como a disponibilização de alimento nos parques para incentivar as vacas a permanecerem em pé após a ordenha, para permitir o fechamento do teto. Os microorganismos ambientais mais isolados são: *Escherichia coli*; *Streptococcus uberis*; *Klebsiella*; *Bacillus spp* (Edmondson, 2017).

Ainda se pode considerar mais um tipo de classificação de mastites consoante o período de infecção, existindo as infecções em período de lactação ou as infecções no período seco, normalmente caracterizadas por serem infecções ambientais (Edmondson, 2017).

No contexto desta revisão e tendo em conta o objetivo do trabalho realizado, torna-se indispensável descrever algumas características dos principais microorganismos envolvidos nas mastites:

## **2.2. Mastites contagiosas**

### **2.2.1. *Staphylococcus aureus***

É um coco gram-positivo, responsável por mastites contagiosas, que se podem manifestar na forma crónica ou aguda, sendo mais comum provocarem infecções crónicas subclínicas, convertendo-se em agudas em algumas etapas da lactação como por exemplo no período pós-parto. A principal fonte de infecção é o úbere, transmitindo-se basicamente durante a ordenha através das mãos do ordenhador, das tetinas, ou da partilha entre vacas de panos ou papéis de limpeza dos tetos (Fernández et al., 2016; Saran & Chaffer, 2000). Os sinais clínicos provocados por esta bactéria variam consoante os tipos de mastite provocadas. No caso de mastites clínicas agudas, para além dos sinais clínicos clássicos de uma inflamação do úbere, podem-se desencadear sintomas sistémicos, tais como hipertermia e anorexia, podendo em casos extremos causar uma mastite gangrenosa (Saran & Chaffer, 2000), isto é, quando o quarto afetado surge com zonas de necrose e gangrena, provocadas por uma trombose venosa com edema local e congestão do úbere, que culmina com uma necrose tecidual (Fernández et al., 2016).

O *Staphylococcus aureus* adere à superfície interna da mucosa e da glândula mamária produzindo diversos fatores de virulência. A hialuronidase, estafilocinase e outras proteases colaboram na invasão tecidual, e a sua cápsula permite resistir à fagocitose. Este agente quando fagocitado consegue resistir e multiplicar-se dentro dos macrófagos, sendo libertado periodicamente para os tecidos circundantes, escapando aos mecanismos de defesa do sistema imunitário e à antibioterapia administrada ou preconizada. Libertada por esta bactéria, a toxina alfa gera necrose dos tecidos por contração e necrose dos músculos lisos das paredes dos vasos sanguíneos, impedindo assim o fluxo circulatório adequado ao quarto infectado. Para além disso, esta toxina provoca libertação de enzimas lisossomais dos leucócitos que levam a um incremento da necrose tecidual (Fernández et al., 2016).

Em virtude da sua excreção intermitente, o diagnóstico laboratorial das mastites causadas por *Staphylococcus aureus* e o seu isolamento torna-se extremamente difícil, assim como os resultados das CCS presentes no leite podem ser muito variáveis, não significando uma cultura negativa que o animal esteja isento do agente (Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva et al., 2017).

O tratamento deste tipo de mastites pode ser extremamente complexo, dependendo o seu sucesso sobretudo da idade dos animais afetados, em virtude de que o êxito diminui com o aumento da idade da vaca, porque a probabilidade de cura a partir da quarta lactação é muito baixa (Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva et al., 2017; Edmondson, 2017). A terapia de secagem é vital no tratamento, podendo em vacas novas ter uma eficácia de 70%, diminuindo para cerca de 5 a 10% em vacas mais velhas (Cannas da Silva et al., 2017; Edmondson, 2017), no entanto a sua aplicação diminui o nível de infecção e de exposição do restante rebanho, tornando-se num método de prevenção da sua disseminação (Blowey & Edmondson, 2010).

### **2.2.2. *Streptococcus agalactiae***

É um coco gram-positivo que faz parte da flora comensal do úbere da vaca, embora ocasionalmente possa colonizar o canal e a pele do teto, especialmente se estas superfícies tiverem fissuras (Blowey & Edmondson, 2010).

É um agente altamente contagioso, ocorrendo a sua transmissão através do leite durante o processo de ordenha, tal como acontece com o *Staphylococcus aureus*, que causa sobretudo mastites subclínica, crónica ou recidivante (Saran & Chaffer, 2000). Ainda

assim, pode apresentar-se como uma mastite clínica, com sintomas leves a moderados, com a glândula mamária aumentada de volume e quente, e alterações do aspecto do leite, como a presença de grumos ou flóculos e ou secreção aquosa (Saran & Chaffer, 2000; Fernández *et al.*, 2016).

Os fatores de virulência mais importantes do *Streptococcus agalactiae* são: as hemolisinas; as hialuronidasas; as desoxirribonucleases; as estreptoquinases; e as exotoxinas pirogênicas (Saran & Chaffer, 2000)

É um agente que pode originar elevadas CCS, sem alterações do aspecto do leite, provocando perdas de produção significativas e altas penalizações (Saran & Chaffer, 2000; Fernández *et al.*, 2016; Cannas da Silva *et al.*, 2017; Edmondson, 2017;).

Pode gerar episódios repetidos de mastite, com baixa taxa de cura espontânea, mas com elevadas taxas de cura após antibioterapia durante a lactação, mesmo em animais já com alguma idade (Fernández *et al.*, 2016; Cannas da Silva *et al.*, 2017). É possível erradicar este agente de uma exploração, mediante a terapia de secagem, melhorias no manejo da exploração, e tratamento de todos os animais portadores, sendo estes isolados e tratados com antibiótico, até que as culturas bacteriológicas não detetem portadores (Saran & Chaffer, 2000; Edmondson, 2017).

### **2.2.3. *Streptococcus dysgalactiae***

É um coco gram-positivo hemolítico que origina colónias muito pequenas, que segundo Blowey e Edmondson (2010) é a quarta maior causa de mastites contagiosas, apresentando como alto factor de virulência a produção de toxinas. Os seus métodos de controlo e erradicação são idênticos aos utilizados nos agentes anteriores, respetivamente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Blowey & Edmondson, 2010).

É um microorganismo com grande capacidade de adaptação às condições ambientais, pelo que é comumente encontrado no habitat das vacas leiteiras, estando sobretudo associado ao complexo das mastites de verão. Além do mais, a mosca *Hydrotaea irritans*, vulgarmente encontrada nos estábulos, pode atuar como vetor do agente nos meses de temperaturas mais altas (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

É frequentemente isolado na pele dos tetos, sobretudo quando a sua integridade está comprometida por fissuras, cortes, lesões provocadas pela máquina de ordenha, ou pelo vírus da varíola (Cannas da Silva *et al.*, 2017). Pode também estar presente nas amígdalas e, portanto, a amamentação dos vitelos ou o acto de mamar entre vacas em produção, pode transmitir a infecção aos tetos, sendo por isso, um dos agentes comuns de mastites em novilhas, em bezerros e em vacas secas (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010).

Normalmente provoca mastites clínicas moderadas ou subclínicas, não afectando o estado geral do animal. No entanto os seus fatores de virulência permitem a adesão e colonização de células epiteliais, levando o agente a sobreviver no interior das células sem perder a viabilidade, características estas que estão associadas à facilidade de evolução para uma mastite crónica, à proteção e resistência a antibióticos, e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Fernández *et al.*, 2016). É uma causa pouco comum de CCS elevadas (Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

## **2.3. Mastites ambientais**

### **2.3.1. *Escherichia coli***

Pertencente ao grupo dos coliformes, é um bacilo gram-negativo ubíquo, presente nas fezes, estrume, camas, água e solo (Haskell, 2008; Fernández *et al.*, 2016).

A exposição do úbere ao agente ocorre em especial entre as ordenhas, por deficientes condições de higiene das camas, ou mau maneio após a ordenha (Haskell, 2008).

As mastites causadas por este agente têm um grande impacto do ponto de vista clínico, tendo em conta a diversidade de sintomas locais e sistémicos que as vacas podem apresentar, podendo ocorrer de forma aguda ou hiperaguda como mastite clínica ou subclínica, e provocar uma mastite tóxica com a consequente morte (Saran & Chaffer, 2000; Cannas da Silva *et al.*, 2017;).

A colonização de *E. coli* no canal do teto raramente causa mastites clínicas e em cerca de 70% a 90% dos casos, o agente é eliminado pela própria vaca sem sintomatologia de mastite (Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva *et al.*, 2017). Em algumas vacas,

a única alteração detetável é um aumento na CCS e nas contagens bacterianas, noutros animais apenas são observáveis danos muito leves do revestimento endotelial da parede do teto, com a produção de alguns coágulos leitosos com flóculos brancos e secreção aquosa, que desaparecem na ordenha seguinte (Blowey & Edmondson, 2010).

Geralmente em quadros hiperagudos, as estirpes oportunistas, após colonizarem a glândula mamária de forma ascendente, provocam efeitos clínicos pela libertação de endotoxinas, elaboradas a partir dos lipopolissacarídeos presentes na membrana bacteriana do agente e produzidos durante a sua multiplicação, sendo depois libertados com a morte dos mesmos (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010; Fernández et al., 2016). Durante o desenvolvimento da mastite as endotoxinas são responsáveis pela actividade pirogénica, provocando danos na microvascularização das paredes alveolares, e no tecido intersticial, com ocorrência de coagulação vascular disseminada, alteração da permeabilidade das membranas celulares e do endotélio, levando à toxémia que pode terminar com choque séptico (Saran & Chaffer, 2000; Fernández et al., 2016; Cannas da Silva *et al.*, 2017;).

O início do quadro clínico geralmente é repentino, com a apresentação do animal com sinais de toxémia, tais como anorexia, prostração, hipertermia, leite aquoso e amarelado com flóculos, seguindo-se em poucas horas uma evolução para hipotermia, diarreias intensas e desidratação severa (Fernández *et al.*, 2016).

A variação de respostas em diferentes vacas a uma infecção por *E. coli* é causada pela velocidade com que as células inflamatórias podem ser mobilizadas do sangue para os tetos e para a glândula mamária (Blowey & Edmondson, 2010), tendo já sido demonstrada uma associação entre baixas CCS e uma maior incidência de mastites hiperagudas (Fernández *et al.*, 2016).

### **2.3.2. *Streptococcus uberis***

O *Streptococcus uberis* é um coco gram-positivo não hemolítico (Blowey & Edmondson, 2010), com uma grande heterogeneidade de estirpes, podendo comportar-se como agente ambiental ou contagioso, dependendo da capacidade de adaptação ao hospedeiro (Fernández *et al.*, 2016).

É normalmente encontrado nas camas, sobretudo de palha e orgânicas, nos lábios, patas e no úbere (Schukken *et al.*, 2005; Saran & Chaffer, 2000; Cannas da Silva *et al.*, 2017;).

O papel patogénico de certas estirpes *Streptococcus uberis* é desempenhado por certos fatores de virulência que permitem: a adesão e colonização deste agente nas células epiteliais; a sua evasão a mecanismos de defesa do hospedeiro (incluindo a fagocitose, devido à sua cápsula bacteriana antigénica de ácido hialurónico) (Saran & Chaffer, 2000); e a resistência à antibioterapia (Almeida, Batcha, & Oliver, 2005; Fernández *et al.*, 2016).

As mastites causadas por este agente normalmente ocorrem no primeiro mês pós-parto ou em vacas secas, e apresentam-se como mastites clínicas subagudas ou mastites subclínicas, podendo evoluir para quadros de cronicidade (Blowey & Edmondson, 2010; Fernández *et al.*, 2016).

Embora nalguns casos clínicos de mastite por *Streptococcus uberis* a sintomatologia possa ocorrer de forma repentina, apresentando-se ao exame físico o quarto afetado duro e edemaciado, com libertação de secreções com grandes coágulos brancos no leite, e por vezes com hipertermia severa do animal (Blowey & Edmondson, 2010).

Em suma, a sintomatologia das mastites clínicas por este agente incluem inflamação da glândula mamária e alterações do aspecto do leite, estando descrita uma taxa de cura espontânea de 48% (Fernández *et al.*, 2016).

### **2.3.3. *Staphylococcus Coagulase Negativa (SCN)***

Grupo de bactérias cocos gram-positivo, hemolíticos ou não hemolíticos, que inclui mais de 50 espécies distintas do género *Staphylococcus*, algumas delas fazem parte da flora da pele, sendo consideradas oportunistas quando colonizam o esfíncter e o canal do teto (Blowey & Edmondson, 2010; Fernández *et al.*, 2016).

Estes agentes têm uma capacidade variável de espécie para espécie, de produzir um biofilme, que os protege contra a ação das células imunitárias do hospedeiro e contra a ação dos antibióticos (Fernández *et al.*, 2016).

Originam maioritariamente mastites subclínicas e nalgumas ocasiões mastites clínicas, sendo uma causa do aumento nas CCS (Blowey & Edmondson, 2010; Fernández *et al.*, 2016).

## 2.4. Diagnóstico

Previamente ao tratamento de uma mastite é fundamental identificar o agente causador da mesma a fim de utilizar a terapia mais indicada, fundamentalmente a identificação do agente sobrepõem-se ao teste de sensibilidade antibiótica (TSA) pela simples razão de que um TSA é efetuado *in vitro* e o comportamento dos antibióticos *in vivo* não é idêntico (pH do leite diferente e alterações de leite mastítico que podem dificultar a eficácia do antibiótico). Desta forma, torna-se fundamental a execução da CCS mensalmente para identificar animais com mais de 200 000 células somáticas e envio do leite para exame microbiológico, o que permite identificar quais os agentes prevalentes na exploração. Com a sistematização da CCS laboratorial, ou com o “Teste Californiano de Mastites” (TCM), explorado mais adiante, é possível reduzir drasticamente a utilização de antibióticos e elaborar um quadro epidemiológico da exploração no que diz respeito aos agentes causadores de mastites. É igualmente importante a verificação da máquina e circuitos de ordenha, bem como a avaliação da técnica de ordenha de forma a evitar agressões físicas dos tetos (devido a excesso de vácuo e sobre-ordenha) como acima referido, animais com CCS elevadas devem ser objeto de colheita de leite e posterior análise laboratorial. (Veiga, 1998; Blowey & Edmondson, 2010; Fernández *et al.*, 2016)

A identificação dos microrganismos presentes nos vários tipos de mastites de uma exploração é essencial, não só para definir quais os protocolos e boas práticas a adotar, bem como para definir quais as medidas preventivas a adquirir de forma a reduzir as CCS (Saran & Chaffer, 2000).

Para o diagnóstico de uma mastite é primordial fazer um exame físico detalhado do animal antes da ordenha, com especial atenção ao exame do úbere e dos tetos, procurando diferenças no tamanho ou no formato, apresentando normalmente o quarto afetado um aumento de tamanho assim como uma linfadenomagália dos gânglios retromamários, no entanto, na presença de uma mastite crónica o quarto afetado pode estar atrofiado. Em mastites agudas, à palpação do úbere afetado, é possível identificar nódulos, regiões de fibrose, edema, aumento da temperatura e outros sinais inflamatórios (Veiga, 1998)

Para identificar mastites clínicas é essencial avaliar a aparência dos primeiros jatos de leite sobre uma superfície que contraste, observando possíveis alterações, tais como a

presença de grumos ou flóculos, mudanças de coloração, textura aquosa, filamentosa ou mais espessa, ou presença de pus ou sangue (Veiga, 1998).

As mastites subclínicas não são tão facilmente reconhecidas através dos sinais inflamatórios do úbere, ou das alterações do leite. São necessários exames específicos do leite para identificar e diagnosticar os agentes causadores da doença. Estes exames dividem-se essencialmente em exames laboratoriais, como o caso dos testes eletrónicos de contagem de CCS (“fotossomatic / *fossomatic*”) ou culturas microbiológicas, e exames de campo / exploração, como por exemplo o TCM, testes de condutividade eléctrica, ou o teste “OneFarmCulture®”(OFC) (Radostits, Gay, Hinchcliff, & Constable, 2007).

#### **2.4.1. “Fotossomatic”**

O teste de CCS “Fotossomatic” ou mais vulgarmente conhecido por *fossomatic* é a tecnologia mais avançada para o efeito, utilizando a fluorescência para a contagem de células somáticas. As amostras de leite são diluídas numa solução tampão e misturadas com um corante fluorescente que por microscopia direta deteta o número de células presentes em cada amostra. Este aparelho é totalmente automatizado, podendo processar mais de 100 amostras por hora com uma alta taxa de repetibilidade (VEIGA, 1998; Saran & Chaffer, 2000;).

O factor mais importante de variação das CCS individuais é o número de quartos afetados por microrganismos, no entanto, esta técnica pode camuflar mastites por excessiva diluição do leite de um quarto mastítico com os restantes quartos normais, obtendo-se desta forma CCS totais dentro dos parâmetros aceites (Radostits *et al.*, 2007).

Para além do número de quartos afetados outros fatores podem influenciar as CCS de uma exploração, como o tipo de infecção e microrganismos presentes, a idade da vaca (quanto mais velha maior as CCS), o estágio de lactação (primeiros dias pós-parto e no final da lactação há propensão para CCS mais altas), a produção média do rebanho, e o rigor com que o leite mastítico é separado do tanque de armazenamento (Radostits *et al.*, 2007).

Alguns autores, sugerem que CCS com valores abaixo das 100.000 células/ml são indicativos da presença ou ausência de uma infecção intramamária, balizando este como valor padrão (Radostits *et al.*, 2007; Blowey & Edmondson, 2010).

### 2.4.2. Teste Californiano de Mastites – TCM

O TCM é o teste de campo mais prático, eficiente e barato, para ser realizado em contexto de campo, demonstrando a presença ou não de células somáticas no leite por alteração da consistência deste que se torna gelatinoso. O reagente utilizado tem uma base detergente (Linear Alquil Benzeno Sulfonato de Sódio), que reage com o DNA presente nos núcleos celulares, e um corante indicador de pH (roxo bromesol) que altera a sua cor quando o pH do leite tem valores acima dos valores de referência 6,6 (as mastites incrementam um aumento deste valor acima dos 6,8) (Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007).

Ao haver contacto do reagente utilizado com as células, dá-se a libertação do ácido desoxirribonucleico-DNA presente no núcleo destas que vai provocar o aumento da viscosidade da amostra (Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007).

Para a realização do teste deve-se utilizar a “raquete” de TCM que contém 4 copos iguais, para a qual se recolhe respetivamente uma amostra de cerca de 2 cm<sup>3</sup> (copos com marca de volume) de leite de cada quarto. Em seguida adiciona-se a quantidade de reagente necessário para completar o copo até à marca seguinte, ou seja, 2 cm<sup>3</sup>, mistura-se durante cerca de 20 segundos em movimentos circulares e faz-se a leitura (Veiga, 1998), como demonstrado na Imagem 1.



Imagem 1 – Exemplos de teste TCM

Em função da quantidade e viscosidade de gel formado as amostras são classificadas segundo níveis como negativas, ligeira precipitação, 1+, 2+ ou 3+ como descrito na tabela 2 apresentada em seguida.

**Tabela 2-** Reação do TCM e equivalências com as CCS - Adaptado de (Saran &Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007)

<b>Resultado do teste</b>	<b>Reação Observada</b>	<b>CCS Equivalente</b>
Negativo	Amostra permanece fluida sem espessamento ou formação de gel	0 200 000 células/ml
Ligeira precipitação	Presença de uma leve formação de traços gelatinosos. Esta reação é mais perceptível quando a raquete é balançada de um lado para o outro	150 000 500 000 células/ml
1+	Há formação de gel imediatamente após a mistura das soluções. Esse gel pode-se dissipar com o tempo. Quando a raquete é girada, o fluido não forma uma massa periférica nem a superfície da solução se torna convexa ou abaulada	400 000 1 500 000 células/ml
2+	Há formação de gel ou limo imediatamente após a mistura das soluções. Quando a raquete é agitada, o fluido forma uma massa periférica e o fundo do copo fica exposto	800 000 5 000 000 células/ml
3+	Há formação de gel imediatamente após a mistura das soluções. O gel pode-se dissipar com o tempo. Quando a raquete é agitada, a superfície da solução torna-se convexa ou arredondada.	>5 000 000 células/ml

Se o TCM for utilizado com o objetivo de minimizar os resultados falsos negativos, ou seja com altos valores de sensibilidade, deve-se considerar ligeira precipitação como um resultado positivo, caso contrario para ter valores com uma alta especificidade apenas devemos considerar positivos os resultados com 1+, 2+ e 3+ (Radostits *et al.*, 2007).

Ao fazer este teste deve-se ter em atenção ao tempo de lactação das vacas, pois na semana pós-parto ou nos últimos estágios de lactação podem apresentar reações positivas exuberantes dando origem a falsos positivos (Radostits *et al.*, 2007).

### **2.4.3. Condutividade elétrica**

Uma das primeiras alterações a acontecer na presença de uma reação inflamatória do úbere, provocada pela invasão e multiplicação de microrganismos, é a alteração iónica do leite com um aumento da concentração de iões de sódio e cloro e uma diminuição do potássio, que conseqüentemente provoca um aumento da condutividade elétrica do leite mastítico (Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007;).

Para a análise e estudo destas alterações, hoje em dia as salas de ordenha estão munidas de um sistema de monitorização ligado a um computador de registos, que faz medições de condutividade elétrica do leite a cada ordenha, a cada quarto do úbere isoladamente, criando assim um registo diário com a realização de uma média para cada vaca, que é uma característica individual e que varia entre vacas. Esta média calculada, juntamente com a análise de condutividade diferencial entre os quartos, aumenta a sensibilidade e especificidade do teste permitindo assim a deteção antecipada de uma mastite (Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007;).

A utilização desta tecnologia é de especial interesse, pois mede a real lesão do úbere, em vez de medir a concentração e desenvolvimento dos microrganismos (Radostits *et al.*, 2007).

No entanto deve-se sempre considerar as limitações deste tipo de análise, pois deverão sempre ser analisados os quatro quartos e deverá existir um registo de médias de condutividade para cada vaca, pois estes valores variam consoante a idade, fase produtiva, e a raça. Para além de que, uma vaca que esteja com uma mastite crónica não irá apresentar picos de aumento de condutividade no leite, mantendo-se dentro da sua média habitual (Veiga, 1998; Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.*, 2007)

Outro método utilizado ainda com base neste princípio é a medição da condutividade do leite com um aparelho portátil, num copo para o qual é recolhida uma amostra, sendo neste caso preferível a recolha dos primeiros 3 a 4 jatos de ordenha (Veiga, 1998; Radostits *et al.*, 2007).

#### 2.4.4. “OneFarmCulture®”

O “OneFarmCulture®” (OFC) é um novo sistema de diagnóstico de mastites criado pela “Zoetis” com o conceito de “terapêutica da mastite com base na identificação bacteriológica”, procurando reduzir os impactos económicos negativos que as mastites têm sobre uma exploração e sobretudo reduzir as resistências dos microrganismos aos antimicrobianos, evitando o uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro, com base na deteção de forma rápida e prática dos agentes envolvidos numa mastite.

Para a realização do teste deve ser feito *pré-dipping* do teto, em seguida este deve ser limpo e seco antes de serem eliminados pelo menos os 3 jatos de leite iniciais. Em seguida o esfíncter deve ser desinfetado com álcool, e procede-se à recolha da amostra diretamente para um tubo concebido para o efeito que é imediatamente refrigerado.

Após refrigeração da amostra, com auxílio de uma ansa de plástico estéril, deve-se mergulhar esta na amostra e em seguida arrastar suavemente nas 3 superfícies do meio de cultura da “Placa OFC by Zoetis” mergulhando a ansa a cada mudança de meio.

As placas semeadas devem ser incubadas durante 18 a 24 horas a uma temperatura de 37°C, e em seguida deve ser feita a leitura e interpretação dos resultados conforme o resumo das características do produto representadas nas imagens 2,3, 4 e 5 (RCM).

Se houver crescimento apenas na primeira tira será um caso de *Streptococcus spp.* conforme a imagem 2.



**Imagem 2** - Interpretação de teste "OFC" positivo para *Streptococcus spp* – adaptado de (Zoetis, 2020)

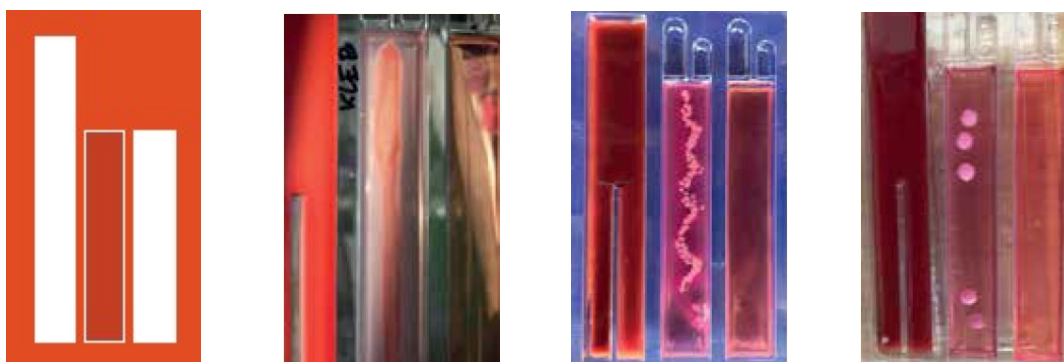
Se houver crescimento na primeira e na terceira tira será um resultado positivo para *Staphylococcus spp*, sendo ainda possível diferenciar *Staphylococcus aureus*, caso haja

hemólise da primeira tira e uma descoloração da terceira tira, conforme exemplo da imagem 3.



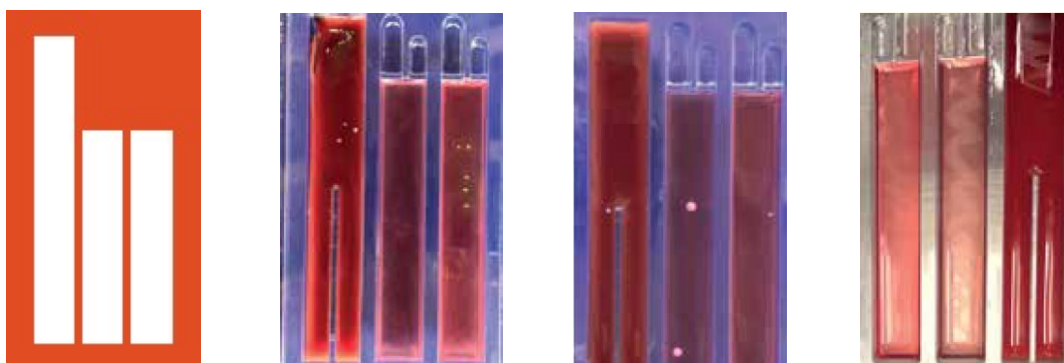
**Imagem 3** - Interpretação de teste "OFC" positivo para *Staphylococcus* spp, sendo na terceira imagem possível ainda identificar um cultura positiva para *Staphylococcus aureus* – adaptado de (Zoetis, 2020)

Se houver crescimento apenas na segunda tira será uma mastite com origem em coliformes, conforme o exemplo da imagem 4.



**Imagem 4** - Interpretação de teste "OFC" positivo para Coliformes – adaptado de (Zoetis, 2020)

Caso não haja crescimento em nenhuma das tiras é considerado um resultado negativo, como o exemplo da imagem 5.



**Imagem 5** - Interpretação de teste "OFC" Negativo – adaptado de (Zoetis, 2020)

## **2.5. Tratamento**

O tratamento de uma mastite varia consoante a sua classificação, desde hiperaguda, aguda ou crónica, consoante os agentes envolvidos, e mediante o quadro clínico exibido pela vaca. Torna-se fundamental que antes de qualquer tratamento executado, seja feita a recolha de leite para envio ao laboratório para pesquisa microbiológica e antibiograma ou Teste de sensibilidade microbiana (TSA).

De salientar que, o uso de antibióticos no tratamento das mastites é realizado essencialmente com o objetivo de eliminar os microrganismos responsáveis, aliviar sintomas, diminuir as perdas de produção, impedir a diminuição da qualidade do leite, diminuir o impacto negativo no úbere, assim como prevenir recidivas (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010).

Atualmente, com o crescente aumento de resistências microbianas aos antibióticos, a escolha destes deve ser criteriosa e deve ter-se em consideração diversos fatores importantes como: sensibilidade dos microrganismos envolvidos ao antibiótico, capacidade de penetração do antibiótico no úbere, capacidade de persistir no úbere numa concentração (mínima inibitória) suficiente para eliminar os microrganismos após infusões únicas ou múltiplas, eficácia na presença de leite, se é bactericida ou bacteriostático, Lipossolubilidade, intervalo de segurança; e o custo/benefício (Blowey & Edmondson, 2010).

### **2.5.1. Tratamento mastites agudas ou hiperagudas**

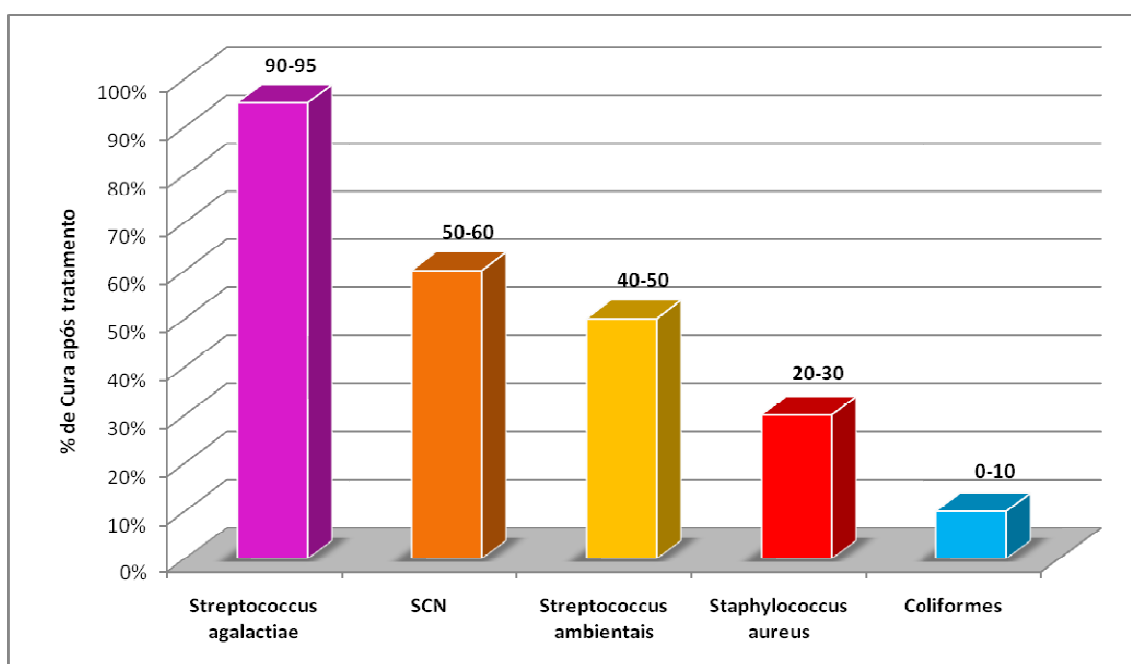
Nas mastites agudas ou hiperagudas o tratamento precoce é fundamental para o seu prognóstico, a pesquisa microbiológica nestes casos é secundária em consequência do tempo necessário para a cultura e antibiograma, sendo o tratamento de suporte para tentar controlar o estado de choque em que o animal se encontra, tão importante como a antibioterapia. Para tal, a estratégia de tratamento passa pela rehidratação, fluidoterapia via parental e oral, restituição do equilíbrio ácido-base e administração de eletrólitos procurando corrigir uma possível acidose metabólica, e antibioterapia normalmente de largo espectro associada a administração de fármacos anti endotóxicos como anti-inflamatórios não esteroides (Fernández *et al.*, 2016). A estratégia de hidratação pode ser efetuada por via endovenosa administrando elevados volumes de soluções isotónicas, ou pela administração de soluções hipertónicas em menor volume, acompanhadas de uma hidratação oral.

No caso da utilização de soluções salinas isotónicas deve-se recorrer à administração de volumes que podem variar entre 20 e 40 litros (L), de solução de Lactato de Ringer (LR) ou uma solução salina de NaCl a 0.9%, em função do grau de desidratação do animal, procurando assim corrigir e restabelecer o equilíbrio ácido-base. Em trabalho de campo, é mais prático a infusão de um volume de 2 a 3 L de solução hipertónica de NaCl a 7,5%, acompanhado de uma reidratação por via oral com um volume de 20 a 40 L de água balanceada electroliticamente (Blowey & Edmondson, 2010; Fernández et al., 2016).

### 2.5.2. Tratamento de mastites subclínicas ou crónicas

O tratamento de mastites subclínicas durante a lactação normalmente não apresenta resultados significativos, sendo por isso economicamente inviável devido aos altos custos do tratamento, *versus* os resultados obtidos. Para além disso, o tratamento isolado dos casos subclínicos, sem a adoção de outras medidas profiláticas e preventivas não irá afetar a incidência de forma significativa no efectivo (Du Preez, 2000; Pyörälä, 2009).

É aconselhado apenas o tratamento ou a aplicação de medidas preventivas em casos de mastites subclínicas provocadas por agentes muito contagiosos, tais como: *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus agalactiae* (Pyörälä, 2009), tal como demonstradas as taxas de sucesso do tratamento no gráfico 5.



**Gráfico 5** - Taxas percentuais de cura após tratamento, para mastites subclínicas causadas por microorganismos mais comuns. Adaptado de (Nickerson & Rayman, 2019).

Como referido no parágrafo anterior, o *Staphylococcus aureus*, é um dos agentes responsáveis pelas mastites subclínicas ou crónicas, com maior impacto nas explorações leiteiras. As características das mastites causadas por este agente são de tal forma graves, que levam ao refugo ou eliminação dos animais positivos ou portadores (Cannas da Silva *et al.*, 2017). Muitos dos quadros apresentam abscessos encapsulados no úbere, onde os agentes microbianos se isolam, protegendo-se assim da ação da antibioterapia, por outro lado, os mesmos microrganismos conseguem adquirir também a capacidade de colonizar células como macrófagos, ficando igualmente protegidos dos antibióticos que circulam nos vários fluidos corporais. A produção de enzimas como as beta-lactamases, é outro mecanismo que torna os *Staphylococcus aureus* resistentes a certas penicilinas. A capacidade deste mesmo agente se manter em estado de latência envolvido numa cápsula mucoide, onde cessa a sua multiplicação, impede-o igualmente de ser reconhecido/destruído pelo organismo hospedeiro (Blowey & Edmondson, 2010). As mastites por *Staphylococcus aureus*, além de originarem quadros subclínicos com grande resistência à antibioterapia, são de difícil deteção, obtendo-se muitas vezes culturas negativas do agente (falsos negativos), sendo de tratamento complexo, pelo que se recomenda o refugo de um animal que apresente no mínimo uma cultura positiva (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

O *Streptococcus agalactiae* é um microrganismo que apenas coloniza os ductos e as cisternas glandulares do úbere pelo que é facilmente acessível aos antibióticos. Normalmente é um agente sensível ao grupo dos betalactâmicos de administração parental, e/ou intramamária com taxas de sucesso no seu tratamento superiores a 80% (Du Preez, 2000; Fernández *et al.*, 2016). O tratamento mais habitual para este tipo de mastites é universalmente denominado de “terapia *Blitz*”, e este implica o tratamento de todos os animais do efectivo pela infusão de antibiótico em todos os quartos durante 3 ordenhas consecutivas. Infecções por *Streptococcus agalactiae* são mais fáceis de diagnosticar e estão mais estritamente associada a elevadas CCS, pelo que se pode optar por realizar um tratamento “*Blitz*” parcial, tratando apenas os animais positivos ou com células somáticas elevadas (Blowey & Edmondson, 2010). A presença de um elevado número de mastites causadas por este agente, deve implicar uma revisão dos métodos de manejo e higiene aplicados na exploração, pois a disseminação do mesmo está diretamente relacionada com erros de higiene e desinfeção durante e após a ordenha, com uma errada gestão do período seco das vacas, erros de calibração da máquina de ordenha, erros na escolha de animais de reposição, e pela desvalorização de casos positivos (Blowey & Edmondson, 2010).

## Antibioterapia

Uma das maiores dificuldades que existe é a escolha de um antibiótico e a fraca correlação entre os testes de sensibilidade *in-vitro* com os resultados dos tratamentos em campo, não podendo estes dados ser extrapolados. Esta falta de correlação deve-se essencialmente à diferença de comportamento dos fármacos na presença do sistema imunitário da vaca, como a presença no leite de imunoglobulinas, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e citocinas, bem como a presença de fatores imunes inespecíficos, como a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozimas. Daí a importância da recolha e análise dos dados obtidos com resultados dos tratamentos nas diferentes explorações (Saran & Chaffer, 2000).

Os antibióticos têm diversos mecanismos de ação, podendo inibir a síntese da parede celular, aumentar a permeabilidade da parede celular ou interferir na síntese proteica e no metabolismo do ácido nucleico e outros processos metabólicos dos microorganismos. Com base na estrutura química e nas semelhanças funcionais, os antibióticos são agrupados em classes (tabela 3), ainda que dentro da mesma classe possam existir diferenças no espectro de actividade e na sua farmacocinética.

**Tabela 3** - Divisão de antibióticos segundo classes - elaborado com base na (Msd & Todo, 2021)

Classificação		Exemplos	
Betalactâmicos	Penicilinas	Penicilina Ampicilina Amoxicilina Penetamato	
	Cefalosporinas	1ª Geração	Cefapirina Cefazolina Cefalexina
		2ª Geração	Cefonicina Cefoxitina Cefuroxima
		3ª Geração	Ceftiofur Cefoperazona
		4ª Geração	Cefquinoma
Glicopeptídeos	Bacitracina		
Aminoglicosídeos	Gentamicina Neomicina Estreptomina		
Tetraciclina	Doxiciclina		

	Oxitetraciclina Tetraciclina
Macrólidos	Tilmicosin Tilosina Eritromicina
Fluoroquinolonas	Enroflaxacina Marbofloxacina
Sulfonamidas	Sulfacetamida Sulfadiazina Sulfametoxazol

Inibem a síntese da parede celular
Inibem a síntese de proteínas
Inibem DNA topoimerases
Inibem a síntese de ácido fólico

**Penicilinas** - são antibióticos betalactâmicos, bactericidas pela ativação de enzimas autolíticas que destroem e inibem a síntese da parede celular bacteriana de alguns microrganismos (Werth, 2021b).

Estas, regra geral, são antibióticos efectivos contra microrganismos gram-positivos e com uma capacidade de penetração razoável no úbere, difundindo-se bem tanto no tecido mamário como nas glândulas saudáveis e mastíticas. Dentro das penicilinas, o penetamato, por ser mais lipofílico que as restantes, é o que tem melhor penetração do úbere e é um dos antibióticos específicos para o *Streptococcus uberis* (Du Preez, 2000; Blowey & Edmondson, 2010;).

O *Staphylococcus aureus* sendo um agente gram-positivo, acaba por ter variadas estirpes resistentes às penicilinas, pela já referida capacidade de produção de beta-lactamases (Blowey & Edmondson, 2010).

**Cefalosporinas**– são antibióticos de largo espectro contra agentes gram-positivos e gram-negativos, incluindo microrganismos produtores de beta-lactamases, no entanto, não têm uma penetração tão eficaz no tecido do úbere como as penicilinas (Blowey & Edmondson, 2010; MSD, 2021). Estas dividem-se em quatro gerações consoante o seu espectro de ação antibacteriana (Werth, 2021a).

As cefalosporinas de primeira geração têm excelente actividade contra bactérias gram-positivas, alguma actividade contra bactérias gram-negativas, mas são completamente

ineficazes no tratamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Werth, 2021a).

As cefalosporinas de segunda geração, apesar de eficazes contra os cocos gram-positivos, são relativamente menos ativas em relação às de primeira geração, mas a sua actividade contra bacilos gram-negativos é superior, sendo por isso frequentemente utilizadas para infecções polimicrobianas. Para o combate a *Staphylococcus aureus* são menos eficazes (Werth, 2021a).

As cefalosporinas de terceira geração têm melhor eficácia contra gram-negativos que as anteriores, mas não têm um aumento da eficácia contra gram-positivos. No entanto são bastante seguras no tratamento de doenças provocadas por enterobactérias que não produzam beta-lactamases (Werth, 2021a).

As cefalosporinas de quarta geração, pela sua capacidade de penetrar mais rapidamente a membrana externa dos microorganismos, assim como pela maior resistência às beta-lactamases possuem maior actividade contra agentes gram-positivos e gram-negativos, incluindo *Pseudomonas* e enterobactérias produtoras de beta-lactamases (Werth, 2021a).

**Aminoglicosídeos** – são ativos contra a maioria dos bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos gram-negativos, mas não têm actividade contra anaeróbios e a maioria das bactérias gram-positivas.

É um grupo de antibióticos formado pela estreptomicina, neomicina e o frameticin, efectivos contra coliformes, agentes gram-negativos, mas com muito pouco poder de penetração no úbere. No entanto, estes são frequentemente utilizados em conjugação com as penicilinas para o tratamento das mastites (Blowey & Edmondson, 2010). O uso sistémico de aminoglicosídeos não é de todo recomendado em animais em lactação pelos elevados intervalos de segurança a que obrigam, correndo-se o risco de contaminação do leite (Du Preez, 2000).

**Tetraciclínas** – são antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese proteica bacteriana.

São frequentemente utilizadas na medicina veterinária, pois são de fácil disponibilidade e custo relativamente baixo (Effendi, Oktavianto, & Hastutiek, 2018), no entanto, para além de serem irritantes para o tecido mamário, tem uma fraca absorção e uma distribuição heterogénea pelo tecido do úbere quando administradas diretamente nos tetos (Blowey & Edmondson, 2010).

Quando administradas via endovenosa, são um fármaco que atinge boas concentrações na glândula mamária, no entanto são facilmente inativadas pelo leite (quelação pelos íons de magnésio e cálcio e por ligação à caseína), provocando por isso resultados de teste de sensibilidade *in vitro* muito diferentes dos resultados reais (Du Preez, 2000).

**Macrólidos** – são antibióticos principalmente bacteriostáticos, com um excelente espectro para o combate a microorganismos gram-positivos aeróbios e anaeróbios, e quando administrados de forma parenteral tem uma boa difusão para os tecidos do úbere. Quando usados no tratamento de uma mastite aguda devem ser combinados com o uso de macrólidos de administração intramamária (Du Preez, 2000). No entanto, a maioria dos *Enterococcus* e dos de *Staphylococcus aureus* são resistentes (MSD, 2021).

**Fluroquinolonas** – são frequentemente utilizadas no tratamento das mastites clínicas durante a lactação e subclínicas no período seco, sobretudo as provocadas por coliformes (Quintiliano & Paranhos da Costa, 2006). Algumas fluroquinolonas mais recentes têm um espectro mais amplo contra *Streptococcus* e contra alguns agentes anaeróbios.

**Sulfonamidas** – são antibióticos bacteriostáticos sintéticos. As sulfonamidas são ativas contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e várias gram-negativas, tendo por isso um bom espectro de ação contra os principais agentes patogénicos de mastites, principalmente quando associados com outros fármacos (Quintiliano & Paranhos da Costa, 2006)

**Antibioterapia conjugada** – frequentemente o tratamento tem e deve ser realizado com a conjugação de pelo menos 2 antibióticos, muitas vezes com formas de aplicação

diferente (parenteral / tópica). O objetivo deste tratamento é poder cobrir um maior espectro de microorganismos conciliando dois ou mais fármacos que se completem e que atuam em sinergia (Blowey & Edmondson, 2010).

### **Anti-inflamatórios**

Juntamente com o uso de antibióticos e de terapias de suporte devem ser usados anti-inflamatórios como a Flunixinina meglumina, meloxicam, carprofeno, cetoprofeno ou o ácido tolfenâmico, com o objetivo de diminuir as tumefações, e a resposta inflamatória, (tabela 4) (Blowey & Edmondson, 2010).

Alguns dos fármacos intramamários disponíveis já contêm anti-inflamatórios esteroides, nomeadamente 10mg de prednisolona, para reduzir a inflamação, turgidez e edema do quarto afetado, permitindo assim uma melhor penetração do antibiótico no tecido, no entanto não podem ser utilizados em vacas gestantes (Blowey & Edmondson, 2010).

Outro dos objetivos do uso de anti-inflamatórios, é o combate das endotoxinas libertadas e dos danos tecidulares, funcionando assim como anti-endotóxico (Fernández *et al.*, 2016).

**Tabela 4** - Opções de AINE a utilizar no tratamento de mastites Adaptado de (Fernández *et al.*, 2016)

<b>Fármaco</b>	<b>Características</b>	<b>Dose</b>
Flunixinina meglumina	AINE, inibidor efeito COX-1 e 2	1,1 – 2,2 mg/kg SID, 3 dias
Meloxicam	AINE COX-1 específico e COX-2 baixo	2 – 4 mg/kg
Carprofeno	AINE, inibidor efeito COX-1 e 2 específico	1,4 mg/kg SC / IV 1 dose
Cetoprofeno	AINE, inibidor não selectivo efeito COX-1 e 2	3 mg/kg SID, 3 dias
Acido tolfenâmico	AINE	4 mg/kg

### **Terapia para vacas secas**

É o tratamento de vacas com mastites subclínicas com a administração de antibiótico de longa ação em todos os quartos das vacas no momento da secagem,

independentemente do estado de infecção do animal. No entanto, com o aumento de resistências aos antibióticos, é aconselhada a terapia seletiva de vacas secas, ou seja, apenas o tratamento de vacas com infecções. A seleção destas vacas deve ser feita com base nas CCS anteriores ao momento da secagem, históricos de mastites e um eventual TCM no momento do tratamento. É também aconselhado um diagnóstico bacteriológico assim como um teste de sensibilidade a antibióticos para que o tratamento efetuado seja o mais direcionado possível para a mastite em causa. A grande maioria dos tratamentos de vaca seca baseiam-se na aplicação intramamária de penicilinas e cefalosporinas de ação prolongada (Saran & Chaffer, 2000; Blowey & Edmondson, 2010; Rajala-Schultz, Nødtvedt, Halasa, & Persson Waller, 2021)

Esta terapia não tem apenas como objetivo tratar mastites já presentes no momento mas também prevenir novas mastites que se possam desencadear durante o período de seca (Blowey & Edmondson, 2010).

Para completar este tratamento é importante também administrar selantes internos na base e no canal do teto para prevenir a entrada ascendente de novos agentes patogénicos. Existem dois tipos de selantes disponíveis, os filmes externos que proporcionam uma barreira física flexível, assemelhando-se a uma película na ponta do teto durante pelo menos 7 dias; Selante de cera do canal interno do teto, mais utilizado e mais efectivo que o anterior, que é um sal de bismuto numa base de cera que é infundido no canal do teto para secar (este selante não tem propriedades antibacterianas, sendo por isso essencial uma higiene rigorosa antes e durante a sua aplicação) (Blowey & Edmondson, 2010)

## 2.6. Prevenção e Maneio

A prevenção e maneio das mastites passa pela gestão multifatorial do meio ambiente e desenho das instalações, pelo bem-estar animal, pela correta terapia e duração de secagem, pela CCS individuais e do efectivo, assim como pela gestão eficiente das alterações metabólicas, prevenção das micotoxinas presentes na alimentação e profilaxia da imunossupressão dos animais, e uma boa corretagem das unguilas com incidência principal nas vacas claudicantes (Fernández *et al.*, 2016).

### 2.6.1. Tipos de Parque

Tal como referido anteriormente a prevenção e a minimização dos riscos de mastites passa essencialmente pela conceção e manutenção de um alojamento e de um ambiente propício para o bem-estar e conforto das vacas, mantendo assim a saúde dos animais e dos úberes (Bickert & Radostits, 2000), favorecendo a eficiência alimentar, a produtividade, o desenvolvimento dos animais, e o controlo de outras doenças e parasitas (Quintiliano & Paranhos da Costa, 2006). Para tal existem atualmente várias opções de parques de estabulação e de camas, tendo todas elas vantagens e desvantagens. A escolha da melhor opção para cada produtor deve ter em conta os custos, áreas disponíveis e a disponibilidade de materiais. No entanto, é fundamental, que as camas dos animais obedeçam a três critérios: 1) cama deve estar sempre limpa; 2) seca e 3) ser confortável, permitindo assim que as vacas descansem 12 a 14 horas diárias minimizando ao máximo ferimentos, contusões, hematomas e abrasões. (Passillé, & Rushen, 2001; Rodenburg, 2005; Haley, De; Mcfarland & Tyson, 2016; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

Para a manutenção de animais em regime intensivo e tendo em vista a manutenção da sua saúde e bem-estar, existem diversas opções e métodos, sendo hoje em dia as opções mais frequentemente utilizadas parques abertos ou de cama livre, ou parques de cubículos (*lojjetes*) universalmente denominados de *free-stall* (Campos, Klosowski, Santos, Gasparino, & Aloísio T. Campos, 2004; Rushen, 2017).

Nos parques de cama livre os animais circulam à vontade por todo o parque, o que representa grande vantagem em termos de conforto, permite que estes se deitem e se levantem com grande facilidade. Neste tipo de alojamento recomenda-se pelo menos 7m<sup>2</sup>/vaca como zona de descanso e 5 a 10 m<sup>2</sup>/vaca como área de exercício e alimentação, no entanto a maioria destes parques peca por falta de espaço por animal, pois é muito fácil não atingir a área mínima (Fernández et al., 2016; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

Os parques de cubículos ou *lojjetes* são parques que permitem a manutenção de mais animais por m<sup>2</sup>, em relação aos anteriores, quando estes são bem desenhados e dimensionados (Cannas da Silva *et al.*, 2017), fornecendo às vacas um espaço de descanso limpo, seco e confortável, quando bem mantidos (Mcfarland & Tyson, 2016). No entanto a sobrelotação, ou seja a presença de cubículos insuficientes para o número de vacas, (é recomendado que existam mais 10% de cubículos para o número de vacas totais presentes no estábulo), aumenta a prevalência de lesões dos tetos, a diminuição da produção de leite, reduzem a longevidade das vacas, e contribuem para a ocorrência de mastites (Buenger, Ducrocq, & Swalve, 2001; Ruud, Bøe, & Østerås, 2010). A ausência de uma cama profunda neste tipo de sistema é um importante factor de risco para o aumento das claudicações, bem como lesões nos curvilhões e joelhos (Husfeldt & Endres, 2012; Solano et al., 2015). Para desenhar um estábulo de cubículos é necessário saber as dimensões das vacas e o espaço de que elas necessitam. O tamanho dos cubículos deve permitir que o animal fique em pé, se deite, faça movimentos para se levantar e deitar sem se magoar ou sentir dor ou medo. Os cubículos não devem apenas ser confortáveis para as vacas, mas também devem ser de fácil manutenção e devem ser mantidos limpos («Ministère de l' Agriculture , de l ' Alimentation et des Affaires rurales», 2020)

### **2.6.2. Tipos de Cama**

A escolha do tipo de cama utilizado vai depender do tipo de alojamento usado (Endres, 2012), no entanto o material da cama deve ser de boa qualidade, confortável, higiénico e durável, ter um baixo custo e minimizar a necessidade de mão-de-obra (Natzke, Bray, & Everett, 1982; Fernández et al., 2016;), preferindo as vacas deitar-se em camas macias, dependendo a suavidade da cama essencialmente da quantidade e qualidade do material utilizado (Herlin, 1997), existindo variadíssimas opções no mercado.

Os diversos tipos de camas podem ser divididos em 2 classes, as de material orgânico e as inorgânicas (Endres, 2012). As orgânicas compreendem camas de palha,

serrim, aparas de madeira, de compostos ou orgânicas e materiais à base de papel e composto. As camas inorgânicas são basicamente de areia ou colchões de borracha.

### **2.6.2.1. Camas orgânicas**

#### **2.6.2.1.1. Camas de Palha**

As camas de palha, quando bem limpa, seca e bem armazenada, são habitualmente extremamente confortáveis, e com uma excelente capacidade de isolamento térmico (Tuytens, 2005; Endres, 2012). No entanto é um material que para ser mantido seco e limpo, se torna bastante dispendioso, não só pela quantidade de material necessário, assim como pela exigência de mão-de-obra (Barnes, 1989). Caso contrário torna-se um ótimo substrato de crescimento de diversos microrganismos patogénicos ambientais, causadores de mastites, tais como *E. coli* e *Streptococcus uberis* (Zdanowicz & Shelford, 2001; Ward et al., 2002; Endres, 2012; Cannas da Silva et al., 2017)

#### **2.6.2.1.2. Serradura, serrim e aparas de madeira**

A serradura, o serrim e as aparas de madeira são dos produtos mais frequentemente utilizados mundialmente nas vacarias de leite. É uma cama que quando em partículas pequenas tem uma excelente capacidade de absorção e uma textura macia proporcionando uma cama confortável. A juntar a estas vantagens, o material permite uma boa gestão dos resíduos por ser facilmente biodegradável. No entanto, permite um rápido crescimento de bactérias e microorganismos, sendo essencial uma constante manutenção e limpeza das camas para que não acumule humidade excessiva. Além do que a sua origem deve ser conhecida e de confiança, devendo esta passar por processos de limpeza e peneira para evitar conter objetos estranhos como pregos, outros objetos cortantes ou perfurantes, o que infelizmente não é uma prática corrente (Endres, 2012).

#### **2.6.2.1.3. Camas de compostos ou orgânicas**

As camas de compostos ou orgânicas são geralmente uma fonte renovável facilmente disponível em grandes quantidades, sendo composta por fibras alimentares não digeridas que são separadas do restante estrume (composto). Estes produtos orgânicos são obtidos a partir dos sistemas de separação de sólidos e líquidos e a parte sólida é colocada ao sol (que em princípio deverá inativar as bactérias, o que poderá não acontecer se por exemplo as temperaturas não forem elevadas ou chover). Porém esta cama é de trabalhosa manutenção, exigindo que seja renovada frequentemente para evitar o início de fermentações indesejáveis, e o consequente aquecimento das camas e crescimento bacteriano (Endres, 2012).

#### **2.6.2.1.4. Materiais de cama à base de papel**

Na procura de soluções eficientes e com um baixo impacto ambiental surgiram diversos produtos à base de papel, como papel picado, polpa de papel ou granulados de papel. Normalmente são materiais com excelentes características térmicas e absorventes, e com um pH alcalino que acaba por ter um efeito desinfetante que retarda o desenvolvimentos de microorganismos, tornando-os uma boa opção para as camas de vacas estabuladas. No entanto quando mal mantidos podem criar uma pasta que após solidificação cria superfícies irregulares e desconfortáveis, assim como facilmente entra em fermentação e o aumento de temperatura pode favorecer o aparecimento de microorganismos patogénicos e é um material pouco disponível e de elevado custo (Endres, 2012).

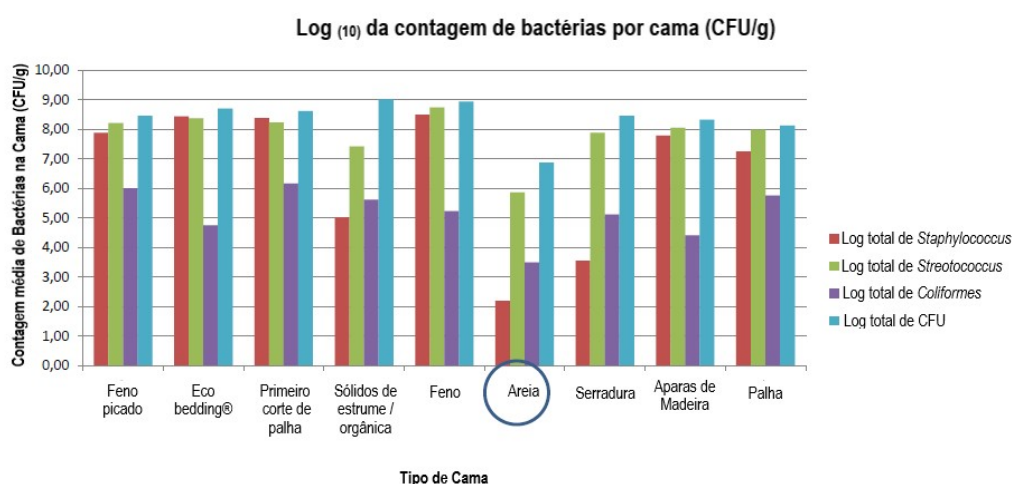
#### **2.6.2.2. Camas inorgânicas**

##### **2.6.2.2.1. Camas de areia**

As camas de areia são uma excelente opção, pois para além de ser um material relativamente económico e de origem inorgânica, normalmente apresenta cargas microbianas significativamente mais baixas em relação aos outros materiais disponíveis, como é possível constatar no gráfico 6, oferecendo um grande conforto, evitando lesões dos curvilhões e unhas, assim como um excelente nível de higiene, desde que sejam bem

mantidas, o que significa arejar e remover diariamente a sujidade da cama (Espejo, Endres, & Salfer, 2006; Endres, 2012; Cook & Nordlund, 2015; Cannas da Silva *et al.*, 2017).

Nas camas de areia é preciso ter atenção ao tamanho das partículas, tendo a areia fina ou com as partículas muito pequenas uma excelente capacidade de reter a água e um conforto superior a uma cama com areia grossa ou de partículas grossas (> 3mm) que se tornam desconfortáveis para os animais. Para além deste factor, a origem da areia é de extrema importância, pelo que a areia de origem natural de partículas arredondadas é consequentemente mais confortável e menos traumática que uma areia proveniente de uma extração por esmagamento de rochas (Endres, 2012).



**Gráfico 6:** Gráfico comparativo da quantidade de microorganismos presentes nos diversos tipos de cama - adaptado de (Ospina&Rauch, 2016)

#### 2.6.2.2.2. Camas de Borracha

O custo em material e mão-de-obra despendidos na manutenção dos tipos de cama anteriormente descritos, assim como a dificuldade de manuseio do esterco e a indisponibilidade de alguns materiais ao longo do ano, desencadeou a pesquisa de novos materiais para fazer face a estes problemas, procurando materiais permanentes ou semi-permanentes, como as camas de borracha (Natzke *et al.*, 1982), camas estas que oferecem várias formas de apresentação no mercado, como colchões e colchões de água, entre outras. No entanto, apesar da facilidade de manutenção e higiene das camas, estas

apresentam-se mais desconfortáveis e menos apetecíveis para as vacas, sendo a longo prazo muito abrasivas, provocando lesões nos curvilhões e quebras produtivas (Cannas da Silva *et al.*, 2017).

Estas camas são fabricadas com uma camada externa de borracha sólida, e no seu interior ou núcleo podem ser preenchidos com aparas de borracha, espuma de polietileno, água, serradura ou cortiça. Estas camas foram desenvolvidas com o intuito de não ser necessária a utilização de mais nenhum substrato sobre as mesmas, no entanto, a sua utilização demonstrou ser mais confortável (Endres, 2012).

As principais vantagens atribuídas a este tipo de cama prende-se com a baixa manutenção, pois quando bem instaladas e pela sua impermeabilidade a fluidos mantêm-se facilmente limpas e secas não oferecendo um substrato de desenvolvimento de microorganismos ou fungos, além disso oferecem uma superfície não abrasiva e antiderrapante, e um bom isolamento térmico (Endres, 2012).

Em seguida, nas imagens 6, 7 e 8 é apresentado um exemplo de um tipo de cama de borracha.



**Imagem 6** - Exemplo de um tapete de borracha coberto com substrato de areia, com uma excelente capacidade de amortização do peso (procedeu-se ao teste de deixar cair de joelhos) utilizado numa exploração acompanhada durante o estágio - Aplicado no Parque (foto do Autor).



**Imagem 7** - Exemplo de um tapete de borracha utilizado numa exploração acompanhada durante o estágio - Superfície superior (foto do Autor).



**Imagem 8** - Exemplo de um tapete de borracha utilizado numa exploração acompanhada durante o estágio - Superfície inferior, com um sistema e capacidade de amortecimento excelente (foto do Autor).

## 2.7. Objetivos

Neste trabalho foi testado, numa exploração leiteira intensiva, com 3 tipos de camas diferentes, areia, orgânica e borracha, um desinfectante já testado em suiniculturas e aviculturas (em parques em vazio sanitário).

O objetivo fundamental deste estudo foi pesquisar a sua aplicabilidade como inibidor do crescimento de microorganismos nas diversas camas dos bovinos de leite, o que seria de total interesse para a empresa que o representa, pois encontraria uma nova via de comercialização, as explorações leiteiras.

Para este efeito foram analisados os seguintes parâmetros:

- 1) Qual o material de cama com a menor carga microbiana antes da desinfeção;
- 2) Se o desinfectante é eficaz na redução da carga microbiana nos diversos tipos de camas de explorações leiteiras;
- 3) Em que tipos de camas pode ser mais eficaz;
- 4) Qual o tempo de eficácia da desinfeção;

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Caracterização do desinfetante – Hypred Force 7®**

Desinfetante eficaz no combate a doenças contagiosas para espécies pecuárias, com um largo espectro de ação, sendo bactericida a 0.4%, fungicida a 2% e virucida a 1%.

A sua fórmula desinfetante é conseguida pela associação de 3 substâncias ativas biocidas, tendo por 100 g, 13 g de glutaraldeído, 8 g de cloreto de benzalcónio e 1,5 g cloreto de didecildimetil amónio.

É um produto do Grupo 1 de desinfetantes e produtos biocidas, e do tipo 3 e 4 de produtos biocidas destinado à higiene veterinária e desinfetantes de superfícies em contacto com géneros alimentícios e alimentos para animais.

Tem uma apresentação líquida, transparente a amarelo pálido, com um pH de  $6\pm 0,5$ , sem formol.

Modo de utilização: 1) lavar e enxaguar previamente o material e superfícies a desinfetar com água corrente ou detergente comum; 2) pulverizar a baixa pressão numa concentração de 1% (10ml para 1lt de água); 3) manter em contacto durante pelo menos 30 minutos; 4) não enxaguar e deixar secar totalmente na superfície.

(Anexo II e III - ficha técnica do desinfetante)

##### **3.1.2. Caracterização da exploração**

Para a realização deste estudo foi utilizada uma exploração intensiva de vacas leiteiras de média dimensão, situada no distrito de Setúbal com um efectivo médio de 400 animais. Pela reduzida área disponível e por opção do produtor a exploração é do tipo aberta, ou seja, o efectivo é reposto por animais provenientes de outras explorações, já em idade produtiva, pelo que não é feito nenhum tipo de recria de animais.

A exploração funciona com uma rotina diária de 3 ordenhas, feitas de forma mecânica numa sala paralela de 2 linhas com 12 postos cada. Durante 3 dias por semana é

feita uma passagem de todos os animais por um pedilúvio com uma solução desinfetante de sulfato de cobre e formol.

A exploração está dividida em 7 parques, sendo 4 deles parques de vacas em produção. Estes dividem-se em 2 tipos de parques diferentes (livre ou cubículos) e 3 tipos de material de cama diferente (areia, borracha, orgânica) sendo todos eles cobertos, como resumido na tabela 5 e 6.

**Tabela 5-** Divisão dos diversos parques da exploração consoante o tipo de estabulação.

Tipo de Parque	Parques						
	1	2	3	4	5	6	7
	Vacas em Produção				Pré-parto	Doentes	Secas
Livre / Aberta				X	X	X	X
Free-stall / Cubículos	X	X	X				

**Tabela 6-** Divisão dos diversos parques da exploração consoante o tipo de cama utilizado.

Tipo de Cama	Parques						
	1	2	3	4	5	6	7
	Vacas em Produção				Pré-parto	Doentes	Secas
Areia	X	X					
Borracha			X				
Orgânica				X	X	X	
Terra							X

Os parques de vacas em produção podem-se dividir em parques com camas; de areia, material orgânico e de borracha

Parques de Areia - na exploração existem 2 parques destes exatamente com as mesmas características, como apresentado na imagem 9, cada um com um total de 90 animais em produção. São parques com uma área total de 682,5 m<sup>2</sup>, com as camas tipo cubículos, sendo a área total de cama de 321,5 m<sup>2</sup> com um total de 115 cubículos individualizados. Tendo cada cubículo um comprimento total de 2,30 m uma largura de 1,15 m e uma altura na barra ao garrote de 1,20 m ou seja uma área total de cada cama de 2,65 m<sup>2</sup>. Estes parques dispõem cada um de 80 “cornadis” para alimentação dos animais, numa extensão de 52 m, 3 bebedouros automáticos com cerca de 600 litros cada um, e 5 ventiladores de arejamento por parque.

O piso destes parques é em cimento, sendo a limpeza dos corredores feita por rodo de arrastamento, as camas ou “lojettes” são cobertas com areia substituída mensalmente, sendo feita a manutenção diária destas por remoção do esterco ou possíveis fontes de sujidade, e a reposição de material quando necessário.



**Imagem 9** - Parque com camas de areia em estilo "lojete" da exploração em estudo (foto do Autor).

Parque de Borracha - Existe apenas 1 parque com este tipo de material, sendo a sua estrutura muito semelhante aos parques anteriormente descritos, como é possível observar na imagem 10, mas com menor dimensão, pelo que o parque tem um total de 60 vacas em produção. O parque tem uma área total de 405 m<sup>2</sup>, com 62 camas tipo cubículos com as mesmas dimensões que as descritas nos parques de areia, ocupando estas um total de 176,7 m<sup>2</sup>. O parque dispõe de 42 “cornadis” de alimentação, numa extensão de 30 m, 2 bebedouros automáticos de 600 litros cada, e um total de 3 ventiladores.

O piso deste parque é também em cimento, no entanto a limpeza dos corredores é feita a cada ordenha com auxílio de um trator. O material usado nas camas é um tapete de borracha, sendo efetuada diariamente a remoção de possíveis fontes de contaminação.



**Imagem 10** - Parque com camas de borracha em estilo "lojete" da exploração em estudo (foto do Autor).

Parque de matéria orgânica – na exploração existe apenas 1 parque destes que comporta 90 animais e tem uma estrutura completamente diferente dos restantes, como é possível constatar na imagem 11. É um parque aberto, ou livre, com uma área total de 875 m<sup>2</sup>, e uma área de cama não delimitada com cerca de 630 m<sup>2</sup>, sendo esta área apenas delimitada pela presença de material para as vacas se deitarem. Este parque dispõe de 69 “cornadis” de alimentação, 2 bebedouros automáticos com 2400 litros cada, e 4 ventiladores de arejamento.

O piso deste parque é em cimento, sendo a limpeza dos corredores de alimentação e abeberamento feita diariamente com auxílio de um trator, a cama é concentrada diariamente e quando necessário repostado material e é completamente substituída 1 vez por mês.



**Imagem 11** - Parque com camas orgânicas em estilo livre da exploração em estudo (foto do Autor).

Os restantes parques dividem-se em 1 parque de vacas ante parto e parto, 1 parque de vacas secas e 1 parque de vacas doentes.

Os parques de ante parto e de vacas doentes são parques de menor dimensão, com cama livre de matéria orgânica em todo o parque, tendo cada um deles um total de 80 “cornadis” e a presença de 2 bebedouros automáticos de 600 litros cada.

As vacas secas estão num parque ao ar livre podendo quase ser considerado que estão a campo.

## **3.2. Metodologia de trabalho**

### **3.2.1. Teste de sensibilidade**

Para realização do estudo antes de qualquer outro procedimento e após discussão com o laboratório responsável pelo desinfetante, confrontados com a recomendação de que os animais não deveriam estar em contacto com as superfícies desinfetadas nas 24 horas seguintes, foi sugerido que se fizesse um teste de sensibilidade ao produto, no qual foram desinfetadas 3 camas com 3 litros de solução desinfetante a 1% (30 ml de desinfetante e 3 Lt de água). Após desinfeção foram observados e registados todos os animais que se deitaram nas mesmas e foram controlados nas 24 horas seguintes, na procura de possíveis reações inflamatórias do úbere ou superfícies corporais em contacto com a cama, foram igualmente registadas as médias produtivas nas 2 ordenhas seguintes, para comparação com os valores da ordenha anterior à desinfeção, permitindo assim detetar quebras ou flutuações de produtividade, enquanto variáveis de alguma reação ou stress provocado pelo produto.

Foram controladas 6 vacas, as únicas que se deitaram nas primeiras 12 horas nos cubículos previamente desinfetados.

### **3.2.2. Teste de método de amostragem e análise**

Após reunião com a Dra. Ana Cardoso da LMV-Laboratório de Medicina Veterinária, foi aconselhado a que se procedesse a uma fase experimental de recolha de amostras para análise, com o objetivo de testar qual o melhor método de recolha de amostra, procurando o que iria apresentar resultados mais fiáveis e susceptíveis de estudo e interpretação.

Para tal foram recolhidas 6 amostras, de duas formas de colheita diferentes, em 3 tipos de cama diferentes, cama orgânica, cama de areia, cama de borracha. Uma amostra de cada parque, composta por 100g de material da cama de diversas zonas. Uma amostra de cada parque pelo método de esfregaço de superfície com auxílio de umas botas para esfregaço previamente embebidos no “diluyente salino de peptona” (fornecido pelo laboratório – descrição em anexo IV) que eram calçados por cima de uns sapatos plásticos, e com os quais se devia caminhar nas camas percorrendo as mesmas em sucessivos

trajetos longitudinais, depois transversais e diagonais de forma a percorrer toda a área do parque e pisar todo o material disponível.

Após colheita, todas as amostras foram para análise, sendo feitas as pesquisas e contagens de Bolores e Leveduras em suspensão no ar, contagem de bactérias coliformes, contagem de *Escherichia coli*, contagem de *Estafilococcus* coagulase positiva e contagem de microorganismos a 30°C, estes últimos representam um conjunto de microrganismos viáveis que se desenvolvem a 30 °C em presença de oxigénio, incluem todas as células vegetativas, esporos de bactérias, leveduras e bolores. Apresentam uma temperatura ótima de crescimento de 30 °C – 37 °C e uma temperatura mínima a cerca de 7 °C.

(anexo V resultados da primeira análise laboratorial).

### **3.2.3. Desinfecção e recolha de amostras**

A realização do estudo foi coordenado com o produtor responsável pela exploração para que tivesse início no momento em que as camas fossem totalmente trocadas.

No dia de início do estudo, após a limpeza das camas e troca do seu material foram recolhidas as primeiras amostras, pelo método de esfregação de superfície com auxílio de umas botas para esfregação. Para tal, já dentro do parque e após lavagem das botas de borracha, eram colocadas umas proteções plásticas de calçado para que não houvesse contaminação da amostra com resíduos provenientes de outros locais, e por cima destas eram calçadas as botas para esfregação previamente embebidas no “diluyente salino de peptona” (descrição em anexo IV). Em seguida as camas eram percorridas transversalmente, longitudinalmente e na diagonal de forma tentar pisar a maior área possível da cama e assim recolher uma amostra representativa de todas as camas do parque. Após recolhida a amostra, as botas para esfregação eram retiradas com auxílio de umas luvas estéreis e eram acondicionadas dentro de um saco tipo zip para recolha de amostras e eram devidamente identificadas antes de ser acondicionadas em refrigeração. A identificação destas amostras para além da data e hora de recolha tinham a denominação de CA0, CO0 e CB0 respetivamente para cama de areia 0, cama orgânica 0 e cama de borracha 0, sendo o“0” a designação dada à primeira amostra recolhida ou tempo zero, ainda antes de se iniciar qualquer tipo de desinfecção da cama, servindo esta amostra como um valor referência para o total de microorganismos presentes nos diversos tipos de material sem qualquer tratamento.

Após a primeira colheita de amostra seguiu-se a desinfecção do parque com o produto a testar. Foi preparada a solução desinfectante numa concentração de 1 %, ou seja, 10 ml de solução de desinfecção para 1 litro de água, tendo sido feitos 36 litros de solução (360ml de desinfectante, 35,64l de água) para o parque com camas de areia, 18 litros de solução (180ml de desinfectante, 17,82l de água) para as camas de borracha e 56 litros (560ml de desinfectante, 55,44l de água) para o parque de cama orgânica. Em seguida procedeu-se à desinfecção das camas das vacas por pulverização manual a baixa pressão, tentando distribuir a solução homogeneamente por toda a área das camas (marca e modelo do pulverizador em Anexo VI).

Uma hora após a desinfecção, ainda antes do regresso das vacas ao parque foi recolhida a segunda amostra das camas seguindo o mesmo processo e método da recolha anterior. Estas amostras foram denominadas de CA1, CB1 e CO1, seguindo o mesmo esquema de identificação da recolha anterior significando o 1 a recolha feita uma hora após a desinfecção da cama.

Ainda neste dia foram entregues as amostras na LMV, tendo o seu transporte sido feito em condições de refrigeração e temperatura controlada.

Após esta colheita as vacas voltaram aos parques retomando a sua actividade e rotina habitual, incluindo a remoção de matéria fecal dos parques, mas sem qualquer adição de desinfectante ou de novo material nas camas.

Repetiram-se as colheitas de amostras, pelo mesmo processo das recolhas anteriores, 3 dias após a desinfecção, ou seja, 72 horas depois, 6 dias depois ou 144 horas após a desinfecção e 9 dias ou 216 horas após a desinfecção, sendo as amostras identificadas e nomeadas conforme os esquemas anteriores com CA2, CB2 e CO2, CA3, CB3 e CO3, e CA4, CB4 e CO4 respetivamente para as 72 horas, 144 horas e 216 horas pós desinfecção. Todas as amostras colhidas foram entregues no laboratório no dia de recolha, em condições de refrigeração e temperatura controlada, para evitar erros de contagem por deterioração das amostras.

#### **3.2.4. Metodologia de pesquisa ao nível Laboratorial**

A realização das análises laboratoriais ficou a cargo do Laboratório de Medicina Veterinária - LMV, tendo estas sido efetuadas segundo as normas definidas pela responsável do departamento de microbiologia Dra. Ana Cardoso. Os protocolos de

realização destas análises cumprem as normas internacionais e estão definidos no caso da pesquisa de *E. coli* e de coliformes no Anexo VII, e a pesquisa de microorganismos a 30° no Anexo VIII.

### **3.2.5. Método de análise estatística**

Tendo em conta o elevado custo de cada análise laboratorial, os dados encontram-se apresentados como uma única medida para cada condição, impossibilitando a realização de análise estatística e a apresentação de médias  $\pm$  e desvio padrão. Os dados apresentados foram tratados utilizando o software GraphPadPrismversion 6 (GraphPadSoftware.Inc, CA, USA).

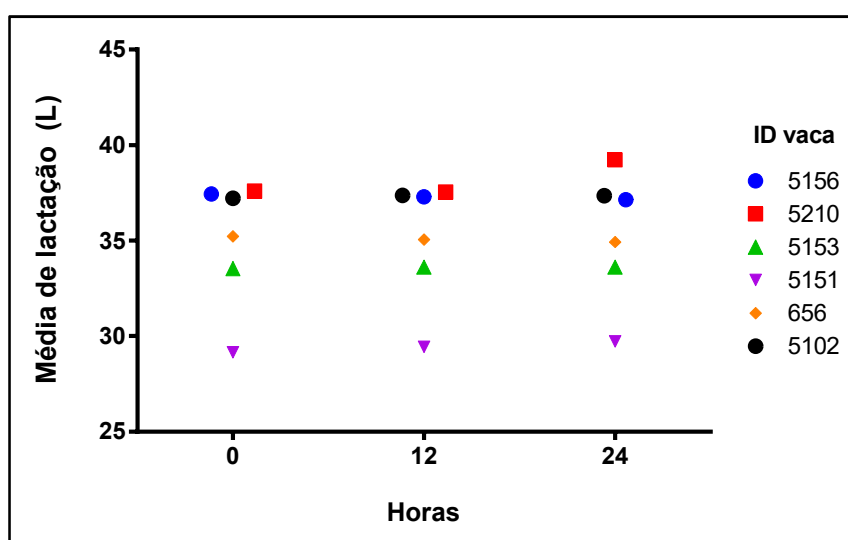
## 4. Resultados

### 4.1. Teste de sensibilidade

Após a observação e identificação dos animais que se deitaram nas 12 horas seguintes nas 3 camas que sofreram desinfecção, seguiu-se o seu controlo durante 24 horas na pesquisa de qualquer tipo de alterações, como sinais de inflamação ou reações alérgicas, sendo os resultados obtidos apresentados na tabela 7. Foram ainda registadas as suas médias produtivas durante as 24 horas seguintes e comparadas com a ordenha anterior a este procedimento, consoante os resultados apresentados no gráfico 7.

**Tabela 7** - Resultados da observação de alterações ao nível da glândula mamária e superfícies em contacto com as camas (0 - sem alterações; 1 - com alterações; SADR – Sem Alterações Dignas de Registo).

ID animal	Idade do Animal	Dias em Lactação	Observações de alterações					Exame Clínico
			Calor	Rubor	Edema	Dor	Outra	
5156	4	178	0	0	0	0	0	SADR
5210	3	157	0	0	0	0	0	SADR
5153	4	215	0	0	0	0	0	SADR
5151	4	195	0	0	0	0	0	SADR
656	6	187	0	0	0	0	0	SADR
5102	5	197	0	0	0	0	0	SADR



**Gráfico 7**- Teste de sensibilidade ao princípio ativo, resultados das médias de lactação nas 2 ordenhas seguintes.

## 4.2. Avaliação da eficácia do desinfetante

Os resultados da avaliação de microorganismos presentes nos 3 tipos de cama estudados foram analisados e comparados com o objetivo de responder às questões colocadas nos objetivos.

Para tal foram comparados os valores de contagens de coliformes, *E.coli* e microorganismos a 30°, com o objetivo de perceber qual a cama que apresentava uma menor carga de microorganismos na hora 0, ou seja, sem qualquer tipo de tratamento ou desinfecção, e ainda para equiparar as curvas evolutivas dos microorganismos ao longo do tempo após a desinfecção, como apresentado respetivamente nos gráficos 8 (Coliformes), 9 (*E.coli*) e 10 (Microorganismos a 30°).

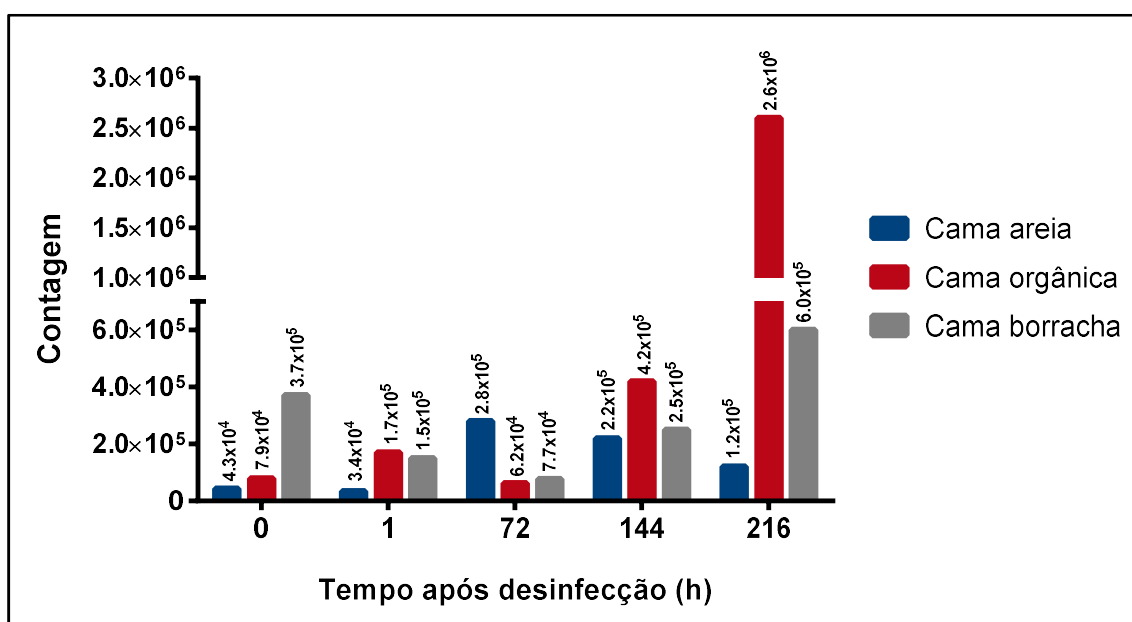


Gráfico 8 - Comparativo das contagens de Coliformes nos três tipos de cama estudados

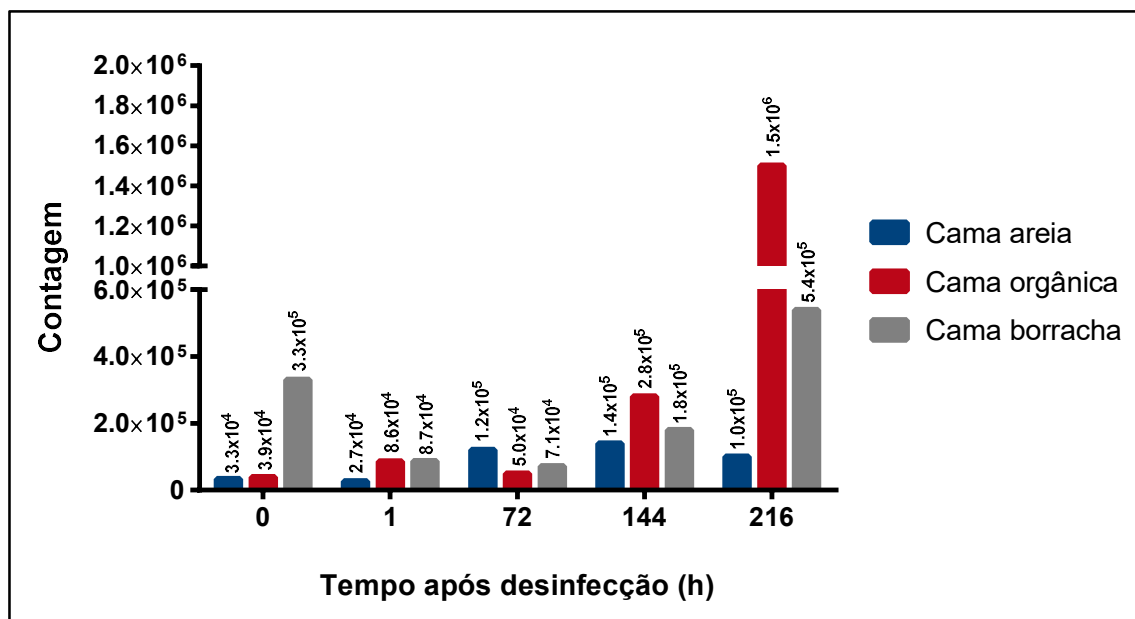


Gráfico 9 - Comparativo das contagens de *E. coli* nos três tipos de cama estudados

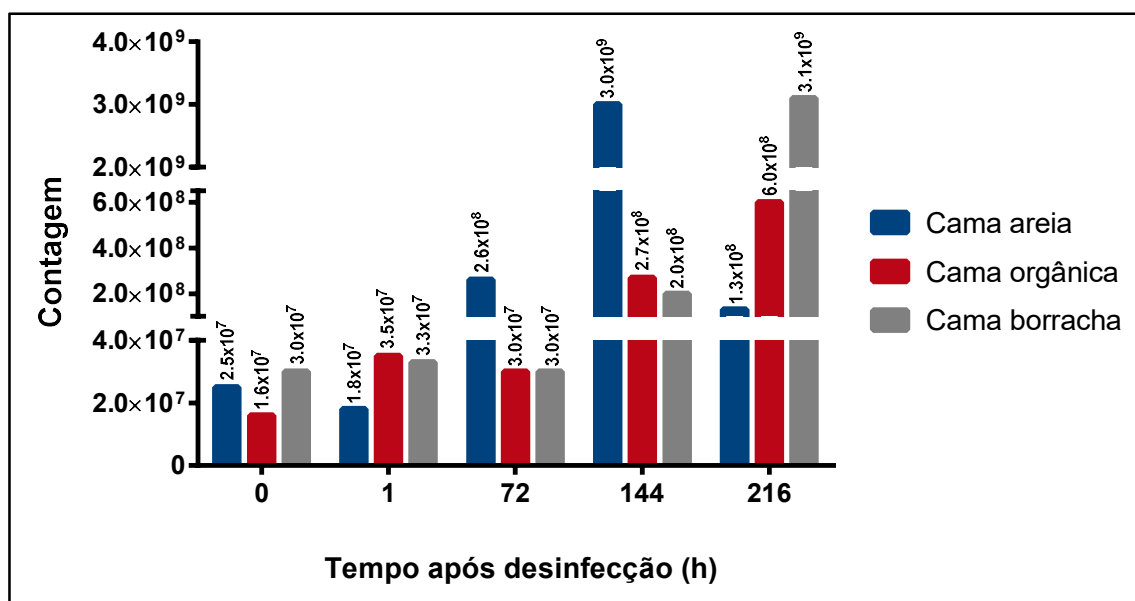


Gráfico 10 - Comparativo das contagens de Microorganismos a 30°C nos três tipos de cama estudados

## 5. Discussão e Conclusão

### 5.1. Discussão

#### Teste de sensibilidade

Um dos factos constatados é que o desinfectante não provocou qualquer tipo de alteração no estado de saúde e produtivo das vacas, o que vem contradizer o fabricante, ao referir na bula que os animais não devem contactar com o mesmo nas primeiras 24 horas, pois poderiam provocar mudanças ao seu estado hígido. Este teste permitiu por isso continuar com o estudo da eficácia da desinfecção das camas das vacas em pavilhões inteiros.

#### Avaliação da eficácia do desinfectante

Com a análise dos dados dos gráficos 8 e 9 pode-se inferir que a cama de areia será a mais indicada para utilização em cubículos por ser inorgânica, e conseqüentemente sem qualquer espécie de desinfectante apresentar as contagens de microorganismos mais baixas. Além de contribuir para um melhor bem-estar dos animais tal como referido por Ospina & Rauch, (2016)

Através das indicações da empresa que comercializa o desinfectante seria expectável uma redução drástica e duradoura da carga microbiana. Este pressuposto não foi verificado, apesar de nas camas de borracha ter sido observada uma redução com uma duração máxima de 144 horas, o que significa que este desinfectante não está indicado para utilização nos diversos tipos de cama no qual foi aplicado. Porém, na cama de tapete de borracha e na cama de areia observou-se uma diminuição das contagens de coliformes 1 hora após a aplicação do desinfectante, o que não aconteceu nas camas orgânicas, que pelo contrário tiveram um aumento das contagens. Às 72 horas manteve-se uma diminuição da contagem de coliformes nas camas de borracha e uma diminuição na cama orgânica, o que sugere que nas camas orgânicas o tempo de atuação máxima do desinfectante é mais retardado do que nos outros tipos de cama. A partir das 144 horas após a aplicação do desinfectante, não há qualquer diminuição ou inibição do crescimento dos coliformes.

Relativamente às contagens de *E.coli* 1 hora após a aplicação do produto houve uma redução nítida das contagens nas camas de areia e de borracha, que se manteve nas camas de borracha até as 72 horas, no entanto na cama orgânica houve uma redução das

contagens às 72 horas, o que sugere novamente que a cama orgânica tem um tempo de atuação máximo do produto mais retardado. A partir das 144 horas volta novamente a não haver uma diminuição dos microorganismos em todos os tipos de camas.

Relativamente às contagens de microorganismos a 30° verificou-se uma diminuição nas camas de areia 1 hora após aplicação do produto, o que não sucedeu quer com as camas de borracha, quer com as camas orgânicas. Porém a carga microbiana nas camas orgânicas e de borracha diminuíram ligeiramente às 72 horas após a aplicação do produto. A partir das 144 horas não se verifica qualquer tipo de redução ou inibição do desenvolvimento dos microorganismos a 30°.

O atraso ou aumento do tempo de actuação máxima do desinfectante nas camas orgânicas, pode dever-se à sua elevada espessura, e á necessidade de movimentação da mesma para sua homogeneização, e assim distribuir o desinfectante por todo o seu volume, movimentação esta conseguida pela utilização da cama por parte dos animais.

Estes resultados sugerem que o desinfectante poderia ter mais eficácia se fosse aplicado com mais frequência, porém seria extremamente dispendioso e trabalhoso, no entanto seriam necessários mais estudos com amostras mais significativas e incluindo mais variáveis para poder afirmar que o produto é eficaz.

Se as camas fossem mudadas com mais frequência, os resultados poderiam ser mais positivos, o que poderia ser objeto de um novo estudo inserindo mais explorações com outros métodos de maneio.

## 5.2. Conclusão

Com este estudo demonstrou-se que o desinfectante “HYPRED FORCE 7®” utilizado não é aplicável para reduzir os coliformes totais, *E.coli*, e microorganismos a 30° em condições normais de camas utilizáveis em explorações de bovinos leiteiros. Apesar de ter havido alguma redução até as 72 horas a mesma não foi de encontro aos resultados espectáveis.

Assim, considera-se que provavelmente a concentração do desinfectante aplicada a cada tipo de cama deveria ser reavaliada, o que significa provavelmente aumentar a dose do mesmo, o que seria talvez incerto por poder provocar reações nos animais.

Considera-se ainda que o aumento da quantidade de desinfectante iria humedecer demasiadamente as camas pondo em causa o bem-estar animal.

Além de que a frequência de limpeza e mudança das camas deveria ser mais frequente, o que leva a querer que daria um resultado melhor, mais eficaz, no entanto muito dispendioso no acréscimo de trabalho na exploração que provavelmente não teria resultados significativos nos efectivos leiteiros.

Por outro lado, seria interessante correlacionar a diminuição de microorganismos nas camas e a ocorrência de mastites nas explorações, o que não tendo sido possível neste estudo por dificuldades logísticas e orçamentais seria um estudo a conjecturar no futuro, usando uma maior amostra de explorações, de tipos de camas e de tipos de manejo.

Apesar de este desinfectante ser extremamente eficaz em vazio sanitário, ficou provado por este estudo que não é aplicável neste tipo de exploração.

No entanto, considera-se que este estudo não pode ser considerado significativo por ser limitado a uma única exploração e a apenas um ensaio.

## 6. Bibliografia

- Almeida, R. A., Batcha, T., & Oliver, S. P. (2005). Persistence of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. Em H. Hogeveen (Ed.), *Mastitis in dairy production - Current knowledge and future solutions* (pp. 137–142). Wageningen - Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Barnes, M. M. (1989). No TitleUpdate on dairy cow housing with particular reference to flooring. *British Veterinary Journal*, 145(5), 436–445.
- Bickert, W. G., & Radostits, O. M. (2000). Housing and Environment for Dairy Cattle. Em W. B. Saunders Company (Ed.), *Herd health: Food animal production medicine* (pp. 475–507). Philadelphia.
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *Mastitis Control in Dairy Herds* (2.<sup>a</sup> ed.; CABI, ed.). Cambridge.
- Buenger, A., Ducrocq, V., & Swalve, H. H. (2001). Analysis of survival in dairy cows with supplementary data on type scores and housing systems from a region of northwest Germany. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1531–1541. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70187-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70187-7)
- Campos, A. T., Klosowski, E. S., Santos, W. B. R., Gasparino, E., & Aloísio T. Campos. (2004). Caracterização do microambiente em secção transversal de um galpão do tipo «free-stall» orientado na direção norte-sul. Obtido 15 de Maio de 2020, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-69162004000100001&lng=en&nrm=iso%3E](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162004000100001&lng=en&nrm=iso%3E). access on 14 May 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162004000100001>.
- Cannas da Silva, J., van Harten, S., & Roque, E. (2017, Novembro). Considerações sobre Mastites Bovinas. *Revista Portuguesa de Buiatria*, 13–24. Obtido de <https://www.apbuiatria.pt/images/arquivo/revistas/revista19/mobile/index.html#p=3>
- Cook, N. B., & Nordlund, K. (2015). *Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS An Update on Dairy Cow Freestall Design*. Obtido de [https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/5house/Update\\_to\\_Stall\\_designAABP.pdf](https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/5house/Update_to_Stall_designAABP.pdf)
- Du Preez, J. H. (2000). Bovine mastitis therapy and why it fails. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 201–208. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.714>
- Edmondson, P. (2017). *ABC of mastitis Edmondson*. Udder Wise.
- Effendi, M. H., Oktavianto, A., & Hastutiek, P. (2018). *Bukti C 08. Tetracycline Resistance Gene In ....55*(December).
- Endres, M. I. (2012). *Bedding Options for Dairy Cows*. 24(1), 361–369.
- Espejo, L. A., Endres, M. I., & Salfer, J. A. (2006). Prevalence of lameness in high-producing Holstein cows housed in freestall barns in Minnesota. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 3052–3058. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72579-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72579-6)
- Fernández, A. P., Rocha, B., Pereira, D., Sesto, F., Morcuende, J. R., Terreu, J. M. T., ... Bexiga, R. (2016). *Manual de Tratamento da Mastite Bovina* (Publicação; Bayer, Ed.).

Lisboa.

- Haley, D. B., De Passillé, A. M., & Rushen, J. (2001). Assessing cow comfort: Effects of two floor types and two tie stall designs on the behaviour of lactating dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 71(2), 105–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00175-1)
- Haskell, S. R. R. (2008). Blackwell’s Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant. Em *Blackwell’s Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant*.
- Herlin, A. H. (1997). Comparison of lying area surfaces for dairy cows by preference, hygiene and lying down behaviour. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 27(4), 189–196.
- Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*.
- Husfeldt, A. W., & Endres, M. I. (2012). Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5626–5634. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5075>
- Lam, T. J. G. M., Van Den Borne, B. H. P., Jansen, J., Huijps, K., Van Veersen, J. C. L., Van Schaik, G., & Hogeveen, H. (2013). Improving bovine udder health: A national mastitis control program in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1301–1311. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5958>
- Mcfarland, D., & Tyson, J. (2016). Pennstate Extension. Obtido 15 de Maio de 2020, de Designing and Building Dairy Cattle Freestalls website: <https://extension.psu.edu/designing-and-building-dairy-cattle-freestalls>
- Ministère de l’ Agriculture , de l’ Alimentation et des Affaires rurales. (2020). Obtido de Confort des vaches laitières - Dimensions des logettes website: [www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/facts/freestaldim.htm](http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/facts/freestaldim.htm)
- MSD. (2021). Antibióticos. Obtido 8 de Maio de 2021, de <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/infecções/antibióticos#>
- Natzke, R. P., Bray, D. R., & Everett, R. W. (1982). Cow Preference for Free Stall Surface Material. *Journal of Dairy Science*, 65(1), 146–153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82163-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82163-2)
- Nickerson, S. ., & Rayman, V. . (2019). Antibiotic Therapy in Mastitis Control for Lactating and Dry Cows | UGA Cooperative Extension. *UGA Cooperative Extension*, 11. Obtido de [https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1516&title=Antibiotic Therapy in Mastitis Control for Lactating and Dry Cows](https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1516&title=Antibiotic%20Therapy%20in%20Mastitis%20Control%20for%20Lactating%20and%20Dry%20Cows)
- Ospina, D. P., & Rauch, M. B. (2016). Relação entre a cama e a mastite Introdução. Em *Relação entre a cama e a mastite Introdução*. Congresso da Associação Portuguesa de Buiatria.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62(4), 40–44. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S40>
- Quintiliano, M. H., & Paranhos da Costa, M. J. R. (2006). Manejo Racional De Bovinos De Corte Em Confinamento : Produtividade E Bem. *Simposium do Nucleo de Estudos em Bovinicultura*.
- RADOSTITS, O., GAY, C., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2007). A Textbook of the

Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats: veterinary medicine. *Veterinary Medicine*.

- Rajala-Schultz, P., Nødtvedt, A., Halasa, T., & Persson Waller, K. (2021). Prudent Use of Antibiotics in Dairy Cows: The Nordic Approach to Udder Health. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(March). <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998>
- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
- Rodenburg, J. (sem data). *Bedding Options : Having Another Look WHAT DOES THE CUSTOMER WANT ?? Comfortable Place to Rest*.
- Rowbotham, R. F., & Ruegg, P. L. (2016). Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6594–6608. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10674>
- Rushen, J. (2017). *Housing and the welfare of dairy cattle*. (January), 53–80. <https://doi.org/10.19103/as.2016.0006.03>
- Ruud, L. E., Bøe, K. E., & Østerås, O. (2010). Associations of soft flooring materials in free stalls with milk yield, clinical mastitis, teat lesions, and removal of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1578–1586. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2752>
- Saran, A., & Chaffer, M. (2000). *Mastitis y Calidad de Leche* (1.<sup>a</sup> ed.; E. Inter-Médica S.A.I.C.I., Ed.). Buenos Aires.
- Schukken, Y. H. S., Ilson, D. J. W., Elcome, F. W., Ikofsky, L. G. A., & Onzalez, R. N. G. (2003). *Review article Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts*. 34, 579–596. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Schukken, Y. H. S., Tikofsky, L. L., & Zadoks, R. N. (2005). environmental control for mastitis prevention, milk quality an food safety. Em Henk Hogeveen (Ed.), *Mastitis in dairy production - Current knowledge and future solutions* (pp. 109–114). Wageningen - Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Solano, L., Barkema, H. W., Pajor, E. A., Mason, S., LeBlanc, S. J., Zaffino Heyerhoff, J. C., ... Orsel, K. (2015). Prevalence of lameness and associated risk factors in Canadian Holstein-Friesian cows housed in freestall barns. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6978–6991. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9652>
- Tuytens, F. A. M. (2005). The importance of straw for pig and cattle welfare: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 92(3), 261–282. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.05.007>
- VEIGA, V. M. D. O. (1998). Diagnóstico da mastite bovina. *Embrapa*, 51, 24.
- W K Fulwider, T Grandin, D J Garrick, T E Engle, N L Dalsted, W D Lamm, & B E Rollin. (2013). *Effect of Stall Base Type on Herd Health, Costs, and Producer Satisfaction*. 2–5. <https://doi.org/10.13031/2013.22809>
- Ward, W. . R., Hughes, J. W., Faull, W. B., Cripps, P. J., Sutherland, J. P., & Sutherst, J. E. (2002). Observational study of temperature , moisture , pH and bacteria in straw bedding , and faecal consistency , cleanliness and. *Veterinary Record*, 151, 2002.
- Werth, P. B. J. (2021a). Cefalosporinas. Obtido de <https://www.msmanuals.com/pt->

pt/profissional/doenças-infecciosas/bactérias-e-fármacos-antibacterianos/cefalosporinas#

Werth, P. B. J. (2021b). Penicilinas. Obtido de 2018 website:  
<https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doenças-infecciosas/bactérias-e-fármacos-antibacterianos/penicilinas#>

Zdanowicz, G., & Shelford, J. (2001). Sand or sawdust? Bacterial counts in bedding and on teat ends. *UBC Research Reports*, 1/5, 2002.

## **7. Anexos**

## Anexo I – Triptico “One Farm Culture” by Zoetis



## ON FARM CULTURE BY ZOETIS

A mastite é a patologia mais frequente e com maior repercussão económica nas explorações de bovinos de aptidão leiteira, a nível mundial. Os custos desta doença devem-se, sobretudo, aos tratamentos, à mão de obra extra, à diminuição da produção, à necessidade de descarte do leite das vacas afectadas, ao seu impacto negativo na fertilidade, à mortalidade acrescida e ao refugo precoce.

Uma vez que a origem da mastite é, na maioria das vezes, bacteriana, esta doença tornou-se o principal motivo de utilização de antibióticos na produção de leite, merecendo preocupações crescentes do ponto de vista veterinário e humano, no que diz respeito ao desenvolvimento de resistências das bactérias aos antimicrobianos.

Para se obterem resultados satisfatórios e se desacelerar o desenvolvimento destas resistências, os antimicrobianos devem ser seleccionados com base no seu espectro de actividade, o que inclui o diagnóstico do agente patogénico responsável pela doença.

A OFC by Zoetis permite detectar, de uma forma rápida (em menos de 24h) e prática (na exploração) os principais agentes bacterianos de mastite a fim de tornar o tratamento alinhado com o uso racional de antibióticos, mais direccionado, eficaz e sustentável, e evitar custos acrescidos com medicamentos e perdas de leite desnecessárias.

## METODOLOGIA OFC BY ZOETIS

· MATERIAIS · COLHEITA DA AMOSTRA · SEMEITEIRA · CULTURA BACTERIANA

### A. MATERIAIS



### B. COLHEITA DA AMOSTRA

#### RECOLHA DE LEITE MASTÍTICO

- 1 APLIQUE O PRÉ-DIPPING NA SUPERFÍCIE DO TETO E DEIXE ACTUAR POR 30 SEGUNDOS
- 2 LIMPE E SEQUE O TETO, ESPECIALMENTE O ESFÍNCTER
- 3 ELIMINE OS PRIMEIROS JACTOS DE LEITE (NO MÍNIMO TRÊS)
- 4 DESINFECTE O ESFÍNCTER DO TETO COM ÁLCOOL E DEIXE SECAR
- 5 RECOLHA O LEITE INCLINANDO O TUBO DE RECOLHA 45° ATÉ 3/4 DA CAPACIDADE DO MESMO
- 6 REFRIGERE O TUBO IMEDIATAMENTE





**E. INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO**




**ON FARM  
CULTURE**


**ON FARM CULTURE**

 ***Streptococcus spp.***





1. CRESCE NA 1ª TIRA
2. NÃO ALTERA A COR DO MEIO DE CULTURA

 **Coliformes**



1. CRESCE NA 2ª TIRA
2. NÃO ALTERA A COR DO MEIO DE CULTURA
3. COLÓNIAS BACTERIANAS DE COR ROSADA

 ***Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus aureus***



<p><b><i>Staphylococcus spp.</i></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. CRESCE NA 1ª E 3ª TIRA</li><li>2. NÃO ALTERA A COR DO MEIO DE CULTURA</li></ol>	<p><b><i>Staphylococcus aureus</i></b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. CRESCE NA 1ª E 3ª TIRA</li><li>2. PROVOCA HEMÓLISE NA 1ª TIRA</li><li>3. ALTERA A COR DA 3ª TIRA PARA AMARELO</li></ol>
---	---

## ON FARM CULTURE

### Negativo



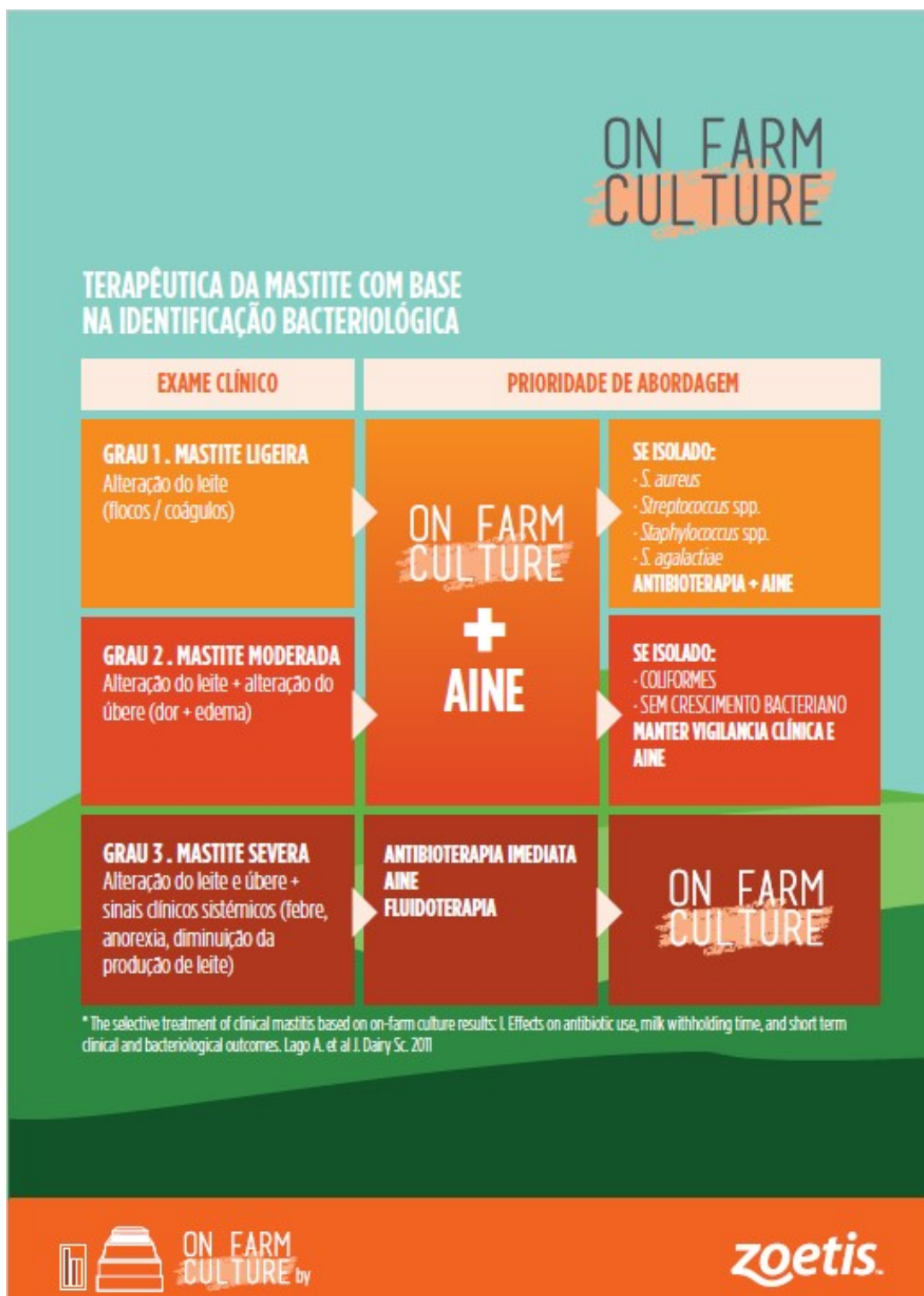
SEM CRESCIMENTO OU CRESCIMENTO NÃO SIGNIFICATIVO

### Crescimento polimorfológico / contaminação



CRESCIMENTO DE NUMEROSAS COLÓNIAS NAS TRÊS FAIXAS E / OU CRESCIMENTO DE COLÓNIAS COM DIFERENTES MORFOLOGIAS





## Anexo II – Flyer “Hypred Force 7®” by Kersya



# HYPRED FORCE 7

Desinfecção de instalações pecuárias


**MILKING**

- 1 Before
- 2 During
- 3 After
- 4 In between/  
Entre/  
Entre

**VANTAGENS DE FORCE 7**

**Tem um largo espectro de ação**

- Bactericida
- Fungicida
- Virucida



### • DESINFEÇÃO

**HYPRED FORCE 7** é uma fórmula desinfetante que associa 3 substâncias activas biocidas:

- Glutaraldeído
- Cloreto de benzalcónio
- Cloreto de didecil dimetil amónio

**HYPRED FORCE 7** é eficaz no combate a doenças consideradas contagiosas para as espécies pecuárias (bovinos, suínos, ovinos e caprinos, cavalos, aves e coelhos):

- Bactericida a 0,4%
- Virucida a 1%
- Fungicida a 2% (*Candida albicans* 0,5%, *Aspergillus fumigatus* 2%)
- Eficaz contra os vírus da gripe das aves e H1N1



### • Modo de utilização:

De forma a assegurar uma boa desinfecção:

- 1 – Limpar as superfícies (com detergente a baixa pressão ou espuma).
- 2 – Enxaguar.
- 3 – Desinfetar com HYPRED FORCE 7, não enxaguar

Disinfectants are regulatory biocides. They have guarantees of efficiency and protection of human, animals and the environment. Use biocides safely. Before use read the label and product information.



## Anexo III –Bula “Hypred Force 7”

FORMULAÇÃO: HYPRED FORCE 7



Data de actualização: 15/07/74

Georgo T. Moura

# HYPRED FORCE 7

Líquido concentrado de utilização exclusivamente

profissional

Biocida de Uso Veterinário

**DESINFETANTE PARA OS EQUIPAMENTOS E INSTALAÇÕES**

**PECUÁRIAS**

**DESINFECTANTE EM INDÚSTRIAS AGRO-ALIMENTARES**

PRODUTOS BIOCIDAS

Composição :

Substância(s) ativa(s) por 100 g de produto : Cloreto de didecil dimetil amónio 1,6g+compostos de amónio quaternário, benzilalquildimetil, cloretos 8g+Glutaral 13g, excipientes q.b.p. 100g

GRUPO 1: Desinfetantes e produtos biocidas gerais; Tipo de produto 3: Produtos biocidas destinados à higiene veterinária; Tipo de produto 4: desinfetantes das superfícies em contacto com os géneros

alimentícios e alimentos para animais

ACM n° 176/00/14NBVPT

### APRESENTAÇÃO

- . Líquido límpido, Transparente a amarelo pálido
- . pH puro :  $6 \pm 0,5$
- . pH a 10 g/l :  $6,5 \pm 1,5$

HYPRED SAS  
55, Boulevard Jules Verger B.P 10180  
35803 DINARD Cedex - FRANCE  
Tél : +33 (0)2 99 16 50 00 / Fax : +33 (0)2 99 16 50 20  
e-mail : hypred@hypred.com

- 1/4-

Produto : **HYPRED FORCE 7** \_\_\_\_\_



Data de actualização: 15/07/14  
Versão: 1.5

Código : 0 301 0

- . Massa volumétrica a 20°C : 1,025±0,01 g/cm<sup>3</sup>
- . Ponto de congelação : -3 °C
- . Mistura de amónios quaternários e glutaraldeído
- . Fórmula sem formol

### **PROPRIEDADES**

- . Desinfectante bactericida e virucida sem formol, para as instalações (estábulo, currais de ovinos e caprinos, pocilgas, pavilhões de criação de aves, cavalariças) material de transporte e material de criação de animais domésticos.

### **APLICAÇÃO**

Modo de utilização:

O HYPRED FORCE 7 é um desinfectante bactericida, leveduricida e virucida (vírus H1N1, H5N1, doença de Newcastle, peste suína, hepatite infecciosa canina, vírus da febre aftosa).

Limpar e enxaguar previamente o material, os edifícios e as superfícies a desinfectar.

\* Pulverização a baixa pressão e aplicação de espuma :

HYPRED SAS  
55, Boulevard Jules Verger B.P 10180  
35803 DINARD Cedex - FRANCE  
Tél : +33 (0)2 99 16 50 00 / Fax : +33 (0)2 99 16 50 20  
e-mail : [hyprod@hyprod.com](mailto:hyprod@hyprod.com)  
= 214 =

Produto : HYPRED FORCE 7



Data de actualização: 10/07/14

Código : 0 301 0

Concentração: 1% (10 ml de HYPRED FORCE 7 para 1 litro de água)

Tempo de contacto :  $\geq$  30 minutos

Temperatura: Ambiente

\* Termonebulização :

Concentração bactericida e virucida: 2,6 ml/m<sup>3</sup>

Tempo de contacto aconselhado: 4 h

Temperatura: Ambiente

Não enxaguar nas aplicações em pecuária.

A aplicação nas instalações pecuárias deve ser feita na ausência de animais (vazio sanitário) e na ausência dos seus alimentos. Remover ou cobrir todos os comedouros e bebedouros do local e deixar que as superfícies tratadas sequem completamente antes de os reabastecer.

Enxaguar com água potável nas aplicações em indústrias agro-alimentares.

Aguardar 24 h antes do regresso das pessoas e dos animais aos locais ou instalações.

Limpar regularmente o material de aplicação.

HYPRED SAS  
55, Boulevard Jules Verger B.P 10180  
35803 DINARD Cedex - FRANCE  
Tél : +33 (0)2 99 16 50 00 / Fax : +33 (0)2 99 16 50 20  
e-mail : hypred@hypred.com

- 3/4-

Produto : **HYPRED FORCE 7** \_\_\_\_\_



Data de actualização: 15/07/14  
Versão: 1.5

Código : 0 301 0

#### **ACONDICIONAMENTO**

Bidão 5l Verde escuro 5kg (caixa 4x5kg)

Bidão 10l Branco 10kg

Utilizar o produto nos 12 meses após a data de fabrico.

#### **SEGURANÇA**

Consultar a ficha de dados de segurança disponível na INTERNET :

<http://www.hypred.com>

#### **LEGISLAÇÃO**

Este produto respeita a legislação relativa aos produtos de limpeza das superfícies podendo estar em contacto com géneros, produtos e bebidas para a alimentação do homem e dos animais.

Utilize os biocidas com cuidado. Leia sempre o rótulo e a informação relativa ao produto antes de o utilizar.

HYPRED SAS  
55, Boulevard Jules Verger B.P 10180  
35803 DINARD Cedex - FRANCE  
Tél : +33 (0)2 99 16 50 00 / Fax : +33 (0)2 99 16 50 20  
e-mail : [hypred@hypred.com](mailto:hypred@hypred.com)  
- A14 -

## Anexo IV – Bula “Diluyente salino de peptona”

### Dehydrated Culture Media

MAXIMUM 

You are viewing the printer friendly version of this page. To return to the regular view click here.

#### RECOVERY DILUENT (PEPTONE SALINE DILUENT)

Code: CM0733

a protective and isotonic diluent for maximal recovery of micro-organisms (ISO/DIS 6649)

**Typical Formula\***

	gm/litre
Peptone	1.0
Sodium chloride	8.5

pH 7.0 ± 0.2 @ 25°C

\* Adjusted as required to meet performance standards

#### Directions

Dissolve 9.5g in 1 litre of distilled water. Dispense into the final containers and sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

#### Description

Maximum Recovery Diluent combines the protective effect of peptone in the diluting solution with the osmotic support of physiological saline<sup>1,2</sup>. The low concentration of peptone does not cause multiplication of the organisms within 45 minutes (@ 20-25°C) of dilution of the sample. The isotonic strength of the diluent ensures recovery of organisms from various sources which may be vulnerable in distilled water or aqueous suspensions.

#### Technique

1. Prepare the medium according to the directions. For the ISO method<sup>3</sup> distribute the medium into 90ml volumes or into 9ml volumes.
2. Put 10g of the test sample into a sterile blender jar or sterile plastic bag.
3. Add 90ml of sterile Maximum Recovery Diluent.
4. Operate the blender according to its speed for sufficient time to give a total number of 15,000-20,000 revolutions. Alternatively operate a peristaltic type blender (Stomacher) for 2 minutes.
5. Within 15 minutes transfer 1ml of the macerate to 9ml of sterile diluent and mix well (10<sup>-1</sup> dilution).
6. Prepare additional decimal dilutions in the same way.
7. Aseptically transfer 1ml of each dilution of the initial suspension in duplicate to the centre of a sterile Petri dish.
8. Prepare pour plates with the medium of choice.
9. Allow the agar to solidify and incubate in a manner appropriate to the agar medium.

#### Storage conditions and shelf life

Store the dehydrated medium at 10-30°C and use before the expiry date on the label.  
Store the prepared medium at room temperature.

#### Appearance

Dehydrated medium: Straw coloured, free-flowing powder  
Prepared medium: Colourless, clear solution

#### Quality control

The diluent is inoculated with each organism, separately, and held at 20-25°C. Counts of colony forming units are obtained at 0 minutes and 45 minutes from inoculation, using suitable nutrient medium. The results are compared, using the time “0” count as the base bench mark.

#### Positive controls: Expected results

*Escherichia coli* ATCC® 25922\* ±50% original count  
*Escherichia coli* ATCC® 8739\* ±50% original count  
*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 ±50% original count

#### References

1. Straker R. P. and Stokes J. L. (1957) *Appl. Microbiol.* 5, 21-25.
2. Patterson J. W. and Cassells J. A. (1963) *J. Appl. Bact.* 26, 493-497.
3. ISO/DIS 6649. *Meat and Meat Products-Detection and Enumeration of Clostridium perfringens.*

## Anexo V- Resultados teste de método de recolha e tipo de análises a realizar



### Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1829169      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-10-10 16:21:27      Data da Colheita: 2018-10-10 14:00:00  
Data de Emissão: 2018-10-17 15:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostr.: Catinas/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carroço      M.V. Contacto:      Higiene/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-10-10 17:00:00      Data de conclusão das análises: 2018-10-17

Cliente a Facturar:

Nome: kersia      N.º Contribuinte: 980560632  
Morada: Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º      Cod. Postal: 1600-209 Lisboa  
Teif.:      Teifm.: 961756487      Fax.:      e-Mail: alvaro.correia@kersia-group.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Palha/Serrim (18288488)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	ufug	-	-	4,2x10 <sup>4</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	ufug	-	-	1,7x10 <sup>06</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	ufug	-	-	3,5x10 <sup>4</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	ufug	-	-	<1,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	ufug	-	-	>3,0x10 <sup>4</sup>

Apreiação: —

Legenda:

n.a - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalala - 2005-110 Almoester STR  
Teif: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1829169      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-10-10 16:21:27      Data da Colheita: 2018-10-10 14:00:00  
Data de Emissão: 2018-10-17 15:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Órgão: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Cama(s)/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higiene/Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-10-10 17:00:00      Data de conclusão das análises: 2018-10-17

Cliente a Facturar:

Nome: kersia      N.º Contribuinte: 980560632  
Morada: Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º      Cod. Postal: 1600-209 Lisboa  
Telf.:      Telem.: 961756487      Fax.:      e-Mail: alvaro.correia@kersia-group.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Borracha (18288440)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	ufc/g	-	-	9,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	ufc/g	-	-	6,1x10 <sup>7</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	ufc/g	-	-	1,1x10 <sup>4</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	ufc/g	-	-	<1,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	ufc/g	-	-	1,7x10 <sup>7</sup>

Apreciação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalala - 2005-110 Almoxar STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::



## Relatório de Ensaio

**Entrada N.º:** 1829169 **Tipo de Análise:** Controlo Ambiental  
**Data de Entrada:** 2018-10-10 16:21:27 **Data da Colheita:** 2018-10-10 14:00:00  
**Data de Emissão:** 2018-10-17 15:16:00 **Resp. pela Colheita:** João Vaillant (Cliente)  
**M. de Amostragem:** **N.º de Amostras:** 1

**Requisitante:** João Maria Homem Vaillant

**Nome/Formador/Código:** João Maria Homem Vaillant **Contacto:** **Data Validade:**  
**Lote:** **Origem/Tipo de Amostra:** Carnes/ Botas **Ponto de Colheita:**  
**Temp. de Colheita:** **Espécie Animal:** Bovinos **Idade:**  
**M.V. Responsável:** Dr. João Carajo **M.V. Contacto:** **Higiene/ Tratamento:**  
**Desinfetante / Método:** **Sintomas:** **Transporte LMV:** Não  
**Qualidade da amostra:** Conforme **Lab. Subcontratado:**  
**Data de início de análise:** 2018-10-10 17:00:00 **Data de conclusão de análise:** 2018-10-17

**Cliente a Facturar:**

**Nome:** kersia **N.º Contribuinte:** 980560632  
**Morada:** Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º **Cod. Postal:** 1600-209 Lisboa  
**Telf.:** **Telm.:** 961756487 **Fax.:** **e-Mail:** alvaro.correia@kersia-group.com

**Microbiologia Clínica e Ambiental**

**AMOSTRA:** Cama Areia (1828641)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	ufc/g	-	-	5,5x10 <sup>6</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	ufc/g	-	-	7,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	ufc/g	-	-	3,5x10 <sup>6</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	ufc/g	-	-	<1,0x10 <sup>1</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	ufc/g	-	-	2,6x10 <sup>7</sup>

**Apreciação:** -

**Legenda:**

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

**Validado por:**

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almôster STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV382.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1829169      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-10-10 16:21:27      Data da Colheita: 2018-10-10 14:00:00  
Data de Emissão: 2018-10-17 15:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higiene/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:      Data de início das análises: 2018-10-10 17:00:00      Data de colheita das análises: 2018-10-17

Cliente a Facturar:

Nome: kersia      N.º Contribuinte: 980560632  
Morada: Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º      Cod. Postal: 1600-209 Lisboa  
Telf.:      Telfm.: 961756487      Fax.:      e-Mail: alvaro.correia@kersia-group.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Bolas Palha/Semim (18288442)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	4,6x10 <sup>6</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	UFC/amostra	-	-	5,9x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	4,1x10 <sup>6</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	UFC/amostra	-	-	<1,0x10 <sup>7</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	2,3x10 <sup>6</sup>

Aprovação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoeste STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1829169 Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-10-10 16:21:27 Data da Colheita: 2018-10-10 14:00:00  
Data de Emissão: 2018-10-17 15:16:00 Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem: N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código: João Maria Homem Vaillant Contacto: Data Validade:  
Lote: Origem/Tipo de Amostra: Camas/ Botas Posto de Colheita:  
Temp. de Colheita: Espécie Animal: Bovinos Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo M.V. Contacto: Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante / Método: Sintomas: Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-10-10 17:00:00 Data de conclusão das análises: 2018-10-17

Cliente a Facturar:

Nome: kersla N.º Contribuinte: 980560632  
Morada: Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º Cod. Postal: 1600-209 Lisboa  
Telf.: Telf.: 961756487 Fax.: e-Mail: alvaro.correia@kersla-group.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Botas Borracha (18288443)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UPC/barrageta	-	-	1,3x10 <sup>4</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	UPC/barrageta	-	-	1,1x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UPC/barrageta	-	-	7,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	UPC/barrageta	-	-	<1,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UPC/barrageta	-	-	1,2x10 <sup>4</sup>

Aprovação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non Índice método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Somateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1829169 Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-10-10 16:21:27 Data da Colheita: 2018-10-10 14:00:00  
Data de Emissão: 2018-10-17 15:16:00 Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem: N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código: João Maria Homem Vaillant Contacto: Data Validade:  
Lote: Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas Porto de Colheita:  
Temp. de Colheita: Espécie Animal: Bovinos Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo M.V. Contacto: Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante / Método: Sintomas: Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-10-10 17:00:00 Data de conclusão das análises: 2018-10-17

Cliente a Facturar:

Nome: kersia N.º Contribuinte: 980560632  
Morada: Rua Tomás da Fonseca C.emp. Torres de Lisboa Torre G 5º Cod. Postal: 1600-209 Lisboa  
Telf.: Telf.: 961756487 Fax.: e-Mail: alvaro.correia@kersia-group.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Botas Areia (18288444)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/gramas	-	-	1,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de bolores e leveduras	Método Interno	UFC/gramas	-	-	1,1x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/gramas	-	-	1,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de Estafilocos coagulase positiva	Método Interno	UFC/gramas	-	-	<1,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/gramas	-	-	2,3x10 <sup>6</sup>

Apreciação: —

Legenda:  
n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Ana Cardoso. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Ana Cardoso  
Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalala - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

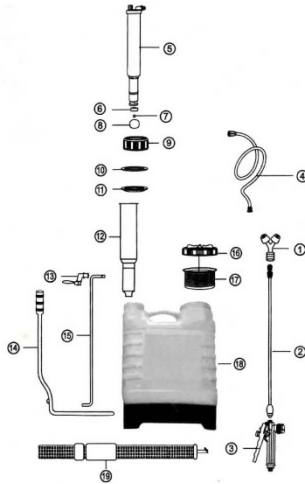
Página 1/1

ID Ent.:1829169 ::

## Anexo VI – Marca e manual de utilização do pulverizador

- > despiece
- > recambios

SU NUEVA TECNOLOGÍA LE GARANTIZA LA CAPACIDAD DE PRESTAR EL MEJOR SERVICIO.



- > utilización

PULVERIZACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS



- > mantenimiento

### enjuagar

después de cada utilización, enjuagar bien con agua clara y hacer funcionar para eliminar completamente todo el resto de producto utilizado.

### lubricar

lubricar periódicamente con aceite de vaselina o similar todas las partes móviles del pulverizador.

mantener fuera del alcance de los niños.

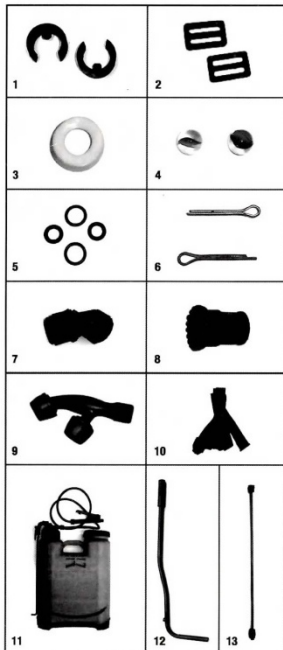
- > garantía

este producto está garantizado contra cualquier defecto de fabricación siempre que sea utilizado dentro de las características técnicas y resistencias para las que ha sido diseñado.

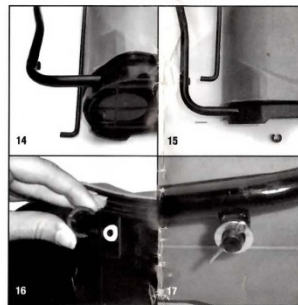
**SU CONCEPCIÓN FUNCIONAL, ROBUSTEZ Y EFICACIA, HACEN QUE SE ADAPTE AL PROFESIONAL MÁS EXIGENTE.**

**MANUAL DE INSTRUCCIONES**

- > provisto de recambios y accesorios / contenido



- > instrucciones de montaje



Para su montaje utilizaremos únicamente los accesorios señalados, manteniendo guardados los recambios para su utilización en el caso de que fuera necesario.

Normalmente la acción del bombeo sobre la palanca, se realiza con la mano izquierda, utilizando la lanza con la mano derecha.

Peso vacío: 2,5 kg

Peso lleno: 14,5 kg

Capacidad nominal del tanque pulverizador: 12 L



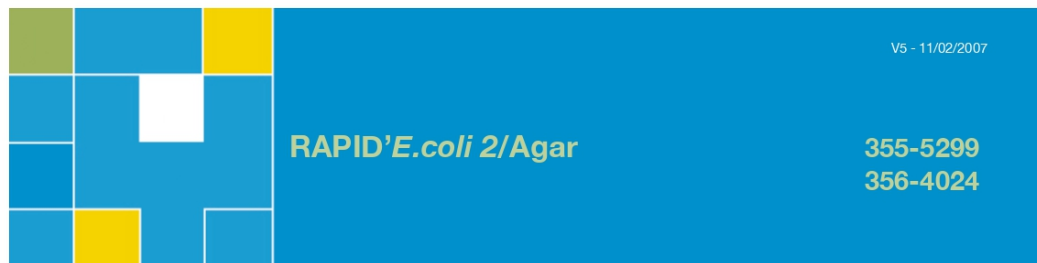
Con el depósito en posición horizontal, introduciremos la palanca (12) en el orificio inferior del depósito. (fig.14) (el más alejado a nuestra espalda) haciendo coincidir el mismo tiempo el alojamiento cilíndrico de la misma con la parte inferior de la biela doblada a tal efecto (fig. 15). Una vez efectuada esta operación debemos fijar la palanca en 2 puntos:

1. En la parte inferior del depósito con la abrazadera (fig.16) de la forma siguiente: Accionaremos la palanca hasta observar en el alojamiento correspondiente el pequeño orificio de la palanca, donde introduciremos la abrazadera (fig.16).

2. En la parte lateral colocaremos la arandela y el pasador, abriendo las 2 patillas para su correcta fijación (fig.17). Una vez realizadas correctamente estas operaciones roscaremos a la lanza la boquilla (nº 7, 8, 9) que se adapte a las funciones que debemos realizar. En el otro extremo de la lanza roscaremos la empuñadura a palanca (grifo).

Las correas (10) se suministran sujetas al pulverizador para su cómoda utilización, aunque también pueden sujetarse individualmente con las hebillas correspondientes en los alojamientos bajo el asa diseñados para tal fin.

## Anexo VII – Método de pesquisa laboratorial de *E. coli* e Coliformes



### DEFINITION

A selective **chromogenic** medium used for direct enumeration **without confirmation of colonies of *Escherichia coli*** and other coliforms in food products for human and animal consumption (depth method) and in water (Membrane-filtration method)

*NB: In the context of AFNOR (The Association Française de Normalisation) only enumerations of *Escherichia coli* and other coliforms in food products for human consumption are validated.*

### AFNOR VALIDATION

The RAPID'*E.coli* 2 method (**Enumeration of *E.coli* at 44°C**) has been validated by AFAQ AFNOR Certification as a valid alternative method to the NF ISO 16649-2 standard for the enumeration of  $\beta$ -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44°C for **all food products intended for human consumption**, according to NF EN ISO 16140: 2003 protocol, under Attestation No: **BRD 07/1-07/93**.  
Valid until: 02/12/2008

The RAPID'*E.coli* 2 method (**Enumeration of *E.coli* at 37°C**) has been validated by AFAQ AFNOR Certification as a valid alternative method to the NF ISO 16649-2 standard for the enumeration of  $\beta$ -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44°C for **all food products intended for human consumption**, according to NF EN ISO 16140: 2003 protocol, under Attestation No: **BRD 07/7-12/04**.  
Valid until: 02/12/2008

The RAPID'*E.coli* 2 method (**Enumeration of coliforms at 37°C**) has been validated by AFAQ AFNOR Certification as a valid alternative method to the NF ISO 4832 standard for the enumeration of coliforms for **all food products intended for human consumption**, according to NF EN ISO 16140: 2003 protocol, under Attestation No: **BRD 07/8-12/04**.  
Valid until: 02/12/2008

### AOAC-RI VALIDATION

RAPID'*E.coli* 2 is validated by the AOAC Research Institute under the *Performance Methods Tested* status, under **Certificate n° 050601**.

### NORDVAL VALIDATION

The RAPID'*E.coli* 2 method (Enumeration of *E. coli* at 44°C) has NordVal approval as a valid alternative method to the NF ISO 16649-2 standard for the enumeration of  $\beta$ -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44°C for **all food products intended for human consumption**.  
Valid until: 01/06/2009

The RAPID'*E.coli* 2 method (Enumeration of *E. coli* at 37°C) has NordVal approval as a valid alternative method to the NF ISO 16649-2 standard for the enumeration of  $\beta$ -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44°C for **all food products intended for human consumption**.  
Valid until: 01/06/2009

The RAPID'*E.coli* 2 method (Enumeration of coliforms at 37°C) has NordVal approval as a valid alternative method to the NF ISO 4832 standard for the enumeration of coliforms for **all food products intended for human consumption**.  
Valid until: 01/06/2009

### STANDARDS

#### FOOD MICROBIOLOGY

- **NF ISO 16649-2 (July 2001)**: Food microbiology – Horizontal method for the enumeration of glucuronidase-positive *Escherichia coli*  $\beta$  - Part 2: Technique of colony count at 44°C by means of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-glucuronate acid (IC: V08-031-2)
- **NF ISO 4832 (July 1991)**: Microbiology – General guidelines for the enumeration of coliforms - Colony count method



Certified by AFAQ AFNOR Certification  
[www.afnor-validation.com](http://www.afnor-validation.com)

## RAPID'E.coli 2/Agar

### PRINCIPLE

The principle of the medium relies on the simultaneous detection of 2 enzymatic activities:  $\beta$ -D-Glucuronidase (GLUC) and  $\beta$ -DGalactosidase (GAL). The medium contains 2 chromogenic substrates:

- one substrate specific to GAL that leads to blue coloration of colonies positive for this enzyme.
- one substrate specific to GLUC that leads to pink coloration of colonies positive for this enzyme.

Coliforms (GAL +/GLUC-) form blue to green colonies, E. coli (GAL +/GLUC +) form violet to pink colonies.

Detection of GLUC makes the culture medium highly specific. *Escherichia coli* is in fact one of the only species of enterobacteria to possess this enzyme.

### NB:

- A few  $\beta$ -D-glucuronidase-negative strains of E. coli exist, e.g. E. coli O157.

- Some serovars of Salmonella and a few species of Shigella possess the enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase (< 1.5%).

### PRESENTATION

- **Ready to use**  
100 ml x 6 bottles **code 355-5299**
- **Dehydrated**  
500 g **code 356-4024**

### STORAGE

- Ready to use: +2-8°C in a dark place
- Dehydrated: +15-25°C, in carefully-sealed bottles in a cool, dry, dark place
- Expiration date and batch number are shown on the package.
- Medium prepared by user from dry medium: 1 month at +2-8°C in a dark place.

### THEORETICAL FORMULA

Peptones	10 g
Sodium chloride	5 g
Yeast extract	3 g
Selective chromogenic mixture	6 g
Agar	13 g
Distilled water	1,000 ml

Final pH (25°C) = 7.2 ± 0.2

### OTHER PRODUCTS REQUIRED (NOT SUPPLIED)

- **RAPID'E.coli 2 Supplement** (Lyophilized): pack of 6 vials (1 vial contains lyophilized in quantity sufficient for 100 ml of RAPID'E.coli 2 medium) (code 355-5298) (utilization in water only)

- **Diluent(s)**
- **Distilled water**

See corresponding Technical Sheet(s)

### EQUIPMENT REQUIRED (NOT SUPPLIED)

(non-exhaustive)

- Scales
- Sterile weighing bags
- Grinder
- Mixer-homogenizer
- 125 ml bottles with autoclave-proof stoppers
- Sterile pipettes (1 ml, etc)
- Sterile Petri dishes (Ø = 55 mm and 90 mm)
- Water-bath precise to ±1°C
- Thermostatically-controlled incubator or incubation room, precise to ±1°C
- Autoclave
- All usual laboratory equipment

### PREPARATION OF DEHYDRATED MEDIUM

#### Always shake before use.

Dissolve 37 g of powder in 1 liter of distilled water. Wait for 5 minutes, then mix until a homogenous suspension is obtained. Heat gently, swirling frequently, then bring to the boil until completely dissolved. Dispense, then sterilize in autoclave at 121°C (± 1°C) for 15 minutes.

**Reconstitution ratio: 37 g/l**  
**500 g of powder reconstitutes 13.5 liters of medium.**

### PROTOCOL

- **Preparation of samples**  
According to the standard applicable to the product concerned

- **Inoculation**

#### Food

- Using sterile pipettes, transfer 1 ml of sample to be tested (liquid product) or 1 ml of stock suspension (other products) and/or 1 ml of its decimal dilutions in sterile Petri dishes (Ø = 90 mm).
- Rapidly pour about 15 ml of melted medium, cooled to 44-47°C.
- Homogenize.
- Leave to solidify on a cool, level surface.

#### Water

- Pour approximately 9 ml (8 to 10 ml) of RAPID'E.coli 2 supplement (code 355-5298) (see corresponding Technical Sheet) per sterile Petri dish (Ø = 55 mm).
- Leave to solidify on a cold, level surface.
- After filtration of 100 ml (or more, depending on the origin) of water to be tested, the membrane is deposited on the surface of the agar (square side uppermost).

## RAPID'E.coli 2/Agar

### • Incubation

Turn the dishes over and incubate at:

- 37°C ± 1°C for 21 hours (± 3 hr) for simultaneous enumeration of *E.coli* and coliforms (= total coliforms)\*.
- 44°C ± 1°C for 21 hours (± 3 hr) for enumeration of *E. coli*.

\* Incubation temperature for which the RAPID'E. coli 2 method has AFNOR validation (alternative method)

### READING AND INTERPRETATION (food products)

For water, refer to the Technical Sheet for RAPID'E.coli 2.

### • Colony count (UFC)

After incubation, count the characteristic colonies:

- Coliforms (other than *E.coli*) = blue
- *E. coli* = violet to pink

As *Escherichia coli* is a species belonging to the coliform group, total coliforms are enumerated by adding together blue-green colonies and violet to pink colonies.

### NB:

- Select only dishes containing fewer than 150 characteristic colonies and fewer than 300 colonies in all.
- Depending on the various calculation methods, dishes containing no colonies can be selected.

### • Expression of results/Calculations

Refer to standard NF ISO 7218 for the calculation method.

### PRECAUTIONS

- For ready to use media prepared in advance, avoid any prolonged overheating during fusion (in general, 20 minutes is enough to obtain a homogenous liquid agar) and supercooling (maximum 6 hr). To conserve an optimal quality the medium must not undergo more than 2 regeneration cycles.
- The medium may look frothy after gelification in bottles. It nevertheless conserves all its qualities when the froth disappears after melting and shaking.
- As development of colonies at the bottom of the Petri dish may interfere with reading, the period between the deposition of the inoculum at the bottom of the dish and the dispensing of the culture medium be limited.  
It is preferable to use a double-layered medium at 37°C for the enumeration of *E. coli* and coliforms in matrices containing abundant mesophilic flora. The aim of the second layer is to limit invasion of the surface, which can interfere with reading (untreated milk, raw meat).

- Avoid trapping any air bubbles underneath the membrane when depositing it on the agar. If necessary, gently and carefully flatten the membrane using tweezers.
- Comply with Good Laboratory Practice.

### QUALITY CONTROL OF MANUFACTURER

Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality-assurance procedure at all stages, from the reception of raw materials to the marketing of the end-product. Each batch of finished product undergoes quality control and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria.

Documentation relative to the production and control of each batch is kept on file.

### PERFORMANCES/QUALITY CONTROL OF THE TEST

The growth performances of the media are verified with the following strains:

STRAIN	Appearance of colonies after 18-24 hr culture at 44°C	
	GROWTH	COLOR
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.8	+	Violet

STRAINS	Aspect of colonies after 18-24 hr culture at 37°C	
	GROWTH	COLOR
<i>Klebsiella oxytoca</i> SDP 12.1.1	+	Blue
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	+	Non typical
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	NA

NA: Not applicable

### KEY WORDS

RAPID'E.coli 2/*Escherichia coli*/Coliforms/  
Food products/Water/Detection/Enumeration/  
Bêta-D-Glucuronidase/Bêta-D-Galactosidase/  
Chromogen/Filtration/Medium

## RAPID'*E.coli* 2/Agar

### BIBLIOGRAPHY

- **Majchrzak V., Facon JP. and Vermeulen M. (April 27-29 1998):** AFNOR validation of the new RAPID'*E.coli* 2 medium for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food. 5<sup>th</sup> Congress of the Société Française de Microbiologie, Lille, France
- **GRAND M. and BAUMGARTNER A. (1996):** Enumeration of *Escherichia coli* by means of selective chromogenic agars – Comparison with the official method. *Trav. Chim. Alim. Hyg.* 87: 623-630
- **MOINI R., GRIMALDI M., ZORZI P., MANI A. and BORDIN P. (1996):** Comparison between selective media “RAPID'*E. coli*” and “VRBA with sodium malonate” for *E. coli* investigation. *Industrie alimentari.* 35: 793-796
- **OCHIN D., SIMON F. and CATTEAU M. (12-15 September 1993):** A new medium for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food. 7<sup>th</sup> international congress on Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology, London UK
- **OCHIN D., SIMON F. and CATTEAU M. (28-29 avril 1993):** New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Paris - Colloque Société Française de Microbiologie

## Anexo VIII - Método de pesquisa laboratorial de Microorganismos a 30°C

INTERNATIONAL  
STANDARD

ISO  
4833-1

First edition  
2013-09-01

---

---

**Microbiology of the food chain —  
Horizontal method for the  
enumeration of microorganisms —**

Part 1:  
**Colony count at 30 °C by the pour plate  
technique**

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour  
le dénombrement des micro-organismes —*

*Partie 1: Comptage des colonies à 30 °C par la technique  
d'ensemencement en profondeur*



Reference number  
ISO 4833-1:2013(E)

© ISO 2013

ISO 4833-1:2013(E)



**COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT**

© ISO 2013

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized otherwise in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, or posting on the internet or an intranet, without prior written permission. Permission can be requested from either ISO at the address below or ISO's member body in the country of the requester.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Published in Switzerland

ii

© ISO 2013 – All rights reserved

<b>Contents</b>	Page
<b>Foreword</b> .....	iv
<b>1 Scope</b> .....	1
<b>2 Normative references</b> .....	1
<b>3 Terms and definitions</b> .....	1
<b>4 Principle</b> .....	2
<b>5 Culture media and diluents</b> .....	2
5.1 General.....	2
5.2 Diluents.....	2
5.3 Agar medium: plate count agar (PCA).....	2
5.4 Overlay medium (if necessary; see 9.2.7).....	3
<b>6 Apparatus</b> .....	4
<b>7 Sampling</b> .....	4
<b>8 Preparation of test sample</b> .....	4
<b>9 Procedure</b> .....	4
9.1 Test portion, initial suspension and dilutions.....	4
9.2 Inoculation and incubation.....	4
9.3 Counting of colonies.....	5
<b>10 Expression of results</b> .....	5
10.1 Method of calculation.....	5
10.2 Precision.....	5
10.3 Interpretation of test results.....	6
<b>11 Test report</b> .....	7
<b>Annex A (informative) Use of the critical difference for the interpretation of results</b> .....	8
<b>Bibliography</b> .....	9

ISO 4833-1:2013(E)

## Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

The procedures used to develop this document and those intended for its further maintenance are described in the ISO/IEC Directives, Part 1. In particular the different approval criteria needed for the different types of ISO documents should be noted. This document was drafted in accordance with the editorial rules of the ISO/IEC Directives, Part 2, [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives).

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights. Details of any patent rights identified during the development of the document will be in the Introduction and/or on the ISO list of patent declarations received, [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents).

Any trade name used in this document is information given for the convenience of users and does not constitute an endorsement.

The committee responsible for this document is ISO/TC 34, *Food products*, Subcommittee SC 9, *Microbiology*.

This first edition, together with ISO 4833-2, cancels and replaces ISO 4833:2003.

ISO 4833 consists of the following parts, under the general title *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms*:

- Part 1: *Colony count at 30 °C by the pour plate technique*
- Part 2: *Colony count at 30 °C by the surface plating technique*

## Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms —

### Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique

#### 1 Scope

This part of ISO 4833 specifies a horizontal method for enumeration of microorganisms that are able to grow and form colonies in a solid medium after aerobic incubation at 30 °C. The method is applicable to:

- a) products intended for human consumption and for animal feed;
- b) environmental samples in the area of food and feed production and handling.

This part of ISO 4833 is applicable to:

- 1) products that require a reliable count when a low limit of detection is specified (below 10<sup>2</sup>/g or 10<sup>2</sup>/ml for liquid samples or below 10<sup>3</sup>/g for solid samples);
- 2) products expected to contain spreading colonies that obscure colonies of other organisms, e.g. milk and milk products likely to contain spreading *Bacillus* spp.

The applicability of this part of ISO 4833 to the examination of certain fermented food and animal feeds is limited and other media or incubation conditions can be more appropriate. However, this method can be applied to such products even though it is possible that the predominant microorganisms in those products are not detected effectively.

For some matrices, the method specified in this part of ISO 4833 can give different results to those obtained using the method specified in ISO 4833-2.

#### 2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

#### 3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

## ISO 4833-1:2013(E)

### 3.1

#### **microorganism**

entity of microscopic size, encompassing bacteria, fungi, protozoa and viruses

[SOURCE: ISO/TS 11139:2006, 3.2.26]

Note 1 to entry: For the purposes of this part of ISO 4833, microorganisms are bacteria, yeasts and moulds that are able to produce colonies under the conditions specified in this part of ISO 4833.

## 4 Principle

A specified quantity of the liquid test sample, or a specified quantity of an initial suspension in the case of other products, is dispensed into an empty Petri dish and mixed with a specified molten agar culture medium to form a poured plate.

Other plates are prepared under the same conditions using decimal dilutions of the test sample or of the initial suspension.

The plates are incubated under aerobic conditions at 30 °C for 72 h.

The number of microorganisms per gram or per millilitre of the test sample is calculated from the number of colonies obtained in the plates containing fewer than 300 colonies.

## 5 Culture media and diluents

### 5.1 General

Follow ISO 11133 for preparation, production and performance testing of culture media.

### 5.2 Diluents

Use the diluent(s) specified in ISO 6887 for the product concerned or the specific International Standard dealing with the product under examination.

### 5.3 Agar medium: plate count agar (PCA)

#### 5.3.1 Composition

Enzymatic digestion of casein	5,0 g
Yeast extract	2,5 g
Glucose, anhydrous (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Agar <sup>a</sup>	9 g to 18 g
Water	1 000 ml

<sup>a</sup> Depending on the gel strength of the agar.

When dairy products are examined, add skimmed milk powder at 1,0 g/l of the culture medium. The skimmed milk powder shall be free from inhibitory substances.

#### 5.3.2 Preparation

Dissolve the components or the dehydrated complete medium in the water, by heating if necessary. Mix thoroughly and leave to stand for several minutes.

ISO 4833-1:2013(E)

Adjust the pH (6.4), if necessary, so that after sterilization it is  $7,0 \pm 0,2$  at 25 °C.

Dispense the medium into tubes, flasks or bottles (6.8) of suitable capacity. Sterilize in an autoclave (6.1) at 121 °C for 15 min.

If the medium is to be used immediately, cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.3) before use. If not, store it in the dark at a temperature of  $(5 \pm 3)$  °C for no longer than 3 months, under conditions which do not allow any change in its composition and properties.

Before beginning the microbiological examination, completely melt the medium, then cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.3) before use. See ISO 11133.

Use the molten agar as soon as possible; it should not be retained for more than 4 h.

### 5.3.3 Performance testing of the culture medium

#### 5.3.3.1 General

Plate count agar is a non-selective medium, used in this part of ISO 4833 as a pour plate. Productivity shall be tested according to ISO 11133.

#### 5.3.3.2 Productivity

Incubation	$(30 \pm 1)$ °C for $(72 \pm 3)$ h
Control strains	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 or WDCM 00012 <sup>a</sup> [World Data Centre for Micro-organisms (WDCM)] <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> WDCM 00003 <sup>a</sup> <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 or WDCM 00034
Reference medium	Tryptone soya agar
Control method	Quantitative
Criterion	Productivity ratio (PR) $\geq 0,7$

<sup>a</sup> The strains to be used as a minimum by the user laboratory. See Reference [Z] for information on culture collection strain numbers and contact details.

### 5.4 Overlay medium (if necessary; see 9.2.7)

#### 5.4.1 Composition

Agar <sup>a</sup>	12 g to 18 g
Water	1 000 ml

<sup>a</sup> Depending on the gel strength of the agar.

#### 5.4.2 Preparation

Add the agar to the water and heat to boiling, stirring frequently until the agar is completely dissolved, or steam for about 30 min.

Adjust the pH (6.4), if necessary, so that after sterilization it is  $7,0 \pm 0,2$  at 25 °C.

Dispense the medium into tubes, flasks or bottles (6.8) of appropriate capacity.

Sterilize in an autoclave at 121 °C for 15 min.

## ISO 4833-1:2013(E)

If the medium is to be used immediately, cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.3) before use. If not, store it in the dark at a temperature of  $(5 \pm 3)$  °C for no longer than 3 months, under conditions which do not allow any change in its composition and properties.

Before beginning the microbiological examination, completely melt the medium then cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.3) before use. See ISO 11133.

## 6 Apparatus

Disposable apparatus is an acceptable alternative to re-usable glassware and plastic if it has suitable specifications.

Usual microbiological laboratory equipment (see ISO 7218) and in particular the following.

- 6.1 **Oven** for dry sterilization or **autoclave** for wet sterilization, used in accordance with ISO 7218.
- 6.2 **Incubator**, capable of being maintained at  $(30 \pm 1)$  °C.
- 6.3 **Water bath**, capable of being maintained at 44 °C to 47 °C.
- 6.4 **pH-meter**, accurate to within  $\pm 0,1$  pH unit at 25 °C.
- 6.5 **Petri dishes**, made of glass or plastic, of diameter 90 mm to 100 mm.
- 6.6 **Total delivery graduated pipettes**, of nominal capacity 1 ml, graduated in 0,1 ml divisions, ISO 835<sup>[1]</sup> class A, or automatic pipettes, ISO 8655-2,<sup>[2]</sup> with use of sterile tips.
- 6.7 **Colony-counting equipment** (optional), consisting of an illuminated base and, optionally, a mechanical or electronic digital counter.
- 6.8 **Tubes, flasks or bottles**, of appropriate capacity and not greater than 500 ml.

## 7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this part of ISO 4833. See the specific International Standard dealing with the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

It is important the laboratory receive a truly representative sample which has not been damaged or changed during transport or storage.

## 8 Preparation of test sample

Prepare the test sample in accordance with the specific International Standard appropriate to the product concerned.

## 9 Procedure

### 9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

Follow the specifications of ISO 6887 or the specific International Standard appropriate to the product concerned.

### 9.2 Inoculation and incubation

9.2.1 Take two sterile Petri dishes (6.5). Transfer to each dish, by means of a sterile pipette (6.6), 1 ml of the test sample if liquid, or 1 ml of the initial suspension ( $10^{-1}$  dilution) in the case of other products. If plates from more than one dilution are prepared, this may be reduced to one dish (ISO 7218).

ISO 4833-1:2013(E)

9.2.2 Take one other sterile Petri dish (6.5). Use another sterile pipette (6.6) to dispense 1 ml of the  $10^{-1}$  dilution (liquid product) or 1 ml of the  $10^{-2}$  dilution (other products).

9.2.3 If necessary, repeat the procedure with the further dilutions, using a new sterile pipette for each decimal dilution.

9.2.4 If appropriate and possible, select only the critical dilutions steps (at least two consecutive decimal dilutions) for the inoculation of the Petri dishes that will give colony counts of between 10 and 300 colonies per plate.

9.2.5 Pour about 12 ml to 15 ml of the plate count agar (5.3) at 44 °C to 47 °C into each Petri dish. The time elapsed between the end of the preparation of the initial suspension (or of the  $10^{-1}$  dilution if the product is liquid) and the moment when the medium (5.3) is poured into the dishes shall not exceed 45 min.

9.2.6 Carefully mix the inoculum with the medium by rotating the Petri dishes and allow the mixture to solidify by leaving the Petri dishes standing on a cool horizontal surface.

9.2.7 After complete solidification, and only in the case where it is suspected that the product under examination contains microorganisms whose colonies overgrow the surface of the medium, pour about 4 ml of the overlay medium (5.4) or plate count agar (5.3) at 44 °C to 47 °C on to the surface of the inoculated medium. Allow to solidify as specified in 9.2.6.

9.2.8 Invert the prepared plates and place them in the incubator (6.2) at  $(30 \pm 1)$  °C, in accordance with ISO 7218. Incubate for  $(72 \pm 3)$  h.

### 9.3 Counting of colonies

9.3.1 After the specified incubation period (9.2.8), retain the plates with, if possible, fewer than 300 colonies. Count the colonies on the plates, using the colony-counting equipment (6.7) if necessary. Examine the dishes under subdued light. It is important that pinpoint colonies be included in the count; however, it is essential that the operator avoid mistaking particles of undissolved or precipitated matter in dishes for pinpoint colonies. Examine doubtful objects carefully, using higher magnification where required, in order to distinguish colonies from foreign matter.

9.3.2 Spreading colonies shall be considered as single colonies. If less than one-quarter of the dish is overgrown by spreading, count the colonies on the unaffected part of the dish and calculate the corresponding number of the entire dish. If more than one-quarter is overgrown by spreading colonies, discard the count.

## 10 Expression of results

### 10.1 Method of calculation

Follow the procedure specified in ISO 7218.

### 10.2 Precision

#### 10.2.1 General

Precision data have been evaluated for dishes containing more than 15 and fewer than 300 colonies. The precision data depend on the flora association and the sample matrix. The data presented are derived from collaborative studies (see References [4]–[6]) and are valid for raw and pasteurized milk. These data may be used as estimates when colony counts in other products are determined.

## ISO 4833-1:2013(E)

### 10.2.2 Repeatability

The absolute difference between two independent single test results, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within a short interval of time, will not be greater than the repeatability limit,  $r = 0,25$ , in  $\log_{10}N$ , where  $N$  is the number of microorganisms per millilitre (corresponding to 1,8 on the normal scale in microorganisms per millilitre).

NOTE This repeatability limit derives from collaborative studies of raw and pasteurized milk (see References [4]–[6]) and can be used for such products.

### 10.2.3 Reproducibility

The absolute difference between two single test results, obtained using the same method on identical test material in different laboratories with different operators using different equipment, will not be greater than the reproducibility limit,  $R = 0,45$ , in  $\log_{10}N$ , where  $N$  is the number of microorganisms per millilitre (corresponding to 2,8 on the normal scale in microorganisms per millilitre).

NOTE This reproducibility limit derives from collaborative studies of raw and pasteurized milk (see References [4]–[6]) and can be used for such products.

## 10.3 Interpretation of test results

### 10.3.1 General

In the examples (10.3.2 and 10.3.3), the average precision data, a probability level of 95 % and the analysis of one sample are considered. It should be noted that, under practical conditions, the average of several samples is often used. The figures are expressed in numbers of microorganisms per millilitre.

### 10.3.2 Repeatability conditions

First result:  $10^5 = 100\ 000$

The difference between the first and the second result should not be greater than  $0,25\log_{10}N$ .

Second result: Lower limit:  $10^{4,75} = 56\ 000$

Upper limit:  $10^{5,25} = 178\ 000$

The difference between the first and the second result is acceptable if the second result is not lower than 56 000 or not higher than 178 000.

### 10.3.3 Reproducibility conditions

Results obtained in the first laboratory (average of duplicate determination):  $10^5 = 100\ 000$

The difference between the first and the second result obtained in the second laboratory should not be greater than  $0,45\log_{10}N$  units:

Second results: Lower limit:  $10^{4,55} = 36\ 000$

Upper limit:  $10^{5,45} = 280\ 000$

The difference between the results obtained by the first and the second laboratory is acceptable, if the second laboratory obtains a result which is not lower than 36 000 and not higher than 280 000.

[Annex A](#) shows the calculation and use of the critical difference (CD) to interpret results.

ISO 4833-1:2013(E)

## 11 Test report

The test report shall contain at least the following information:

- a) all information necessary for the complete identification of the sample;
- b) the sampling method used, if known;
- c) the test method used, with reference to this part of ISO 4833 (ISO 4833-1:2013);
- d) all operating details not specified in this part of ISO 4833, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the test result(s);
- e) the test result(s) obtained;
- f) If the repeatability has been checked, the final quoted result obtained.

ISO 4833-1:2013(E)

## Annex A (informative)

### Use of the critical difference for the interpretation of results

#### A.1 General

In the examples (A.2 and A.3), the average precision data, a probability level of 95 % and the analysis of one sample are considered. It should be noted that, under practical conditions, the average of several samples is often used. The figures are expressed in numbers of microorganisms per millilitre.

#### A.2 Reproducibility conditions

Results obtained in the first laboratory (average of duplicate determination):  $10^5 = 100\ 000$

The difference between this result and a result obtained by a second laboratory (average of  $n$  determinations;  $n = 2$  in this example) is acceptable if it does not exceed the critical difference  $d_C$ , in  $\log_{10}N$  units:

$$d_C = \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = \sqrt{0,45^2 - \frac{0,25^2}{2}} = 0,41$$

where

$r$  is the repeatability limit;

$R$  is the reproducibility limit.

The difference between the results obtained by the first and the second laboratory is acceptable if the second laboratory obtains a result which is not lower than  $10^{4,59} = 39\ 000$  or not higher than  $10^{5,41} = 257\ 000$ .

#### A.3 Comparison with a limit (one-sided test)

Limit:  $10^5 = 100\ 000$

It is necessary to compare the difference between the limit and the laboratory result (average of  $n$  determinations;  $n = 2$  in this example) with the CD limit,  $d_{CL}$ :

$$d_{CL} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = 0,24$$

Test results up to  $10^{5,24} = 174\ 000$  do not indicate non-compliance with the limit.

## Bibliography

- [1] ISO 835, *Laboratory glassware — Graduated pipettes*
- [2] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston pipettes*
- [3] ISO/TS 11139:2006, *Sterilization of health care products — Vocabulary*
- [4] PITON C., & GRAPPIN R. A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods: Application to dry rehydratable film methods and IDG reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1991, **74** pp. 92–103
- [5] SCOTTER S., ALDRIDGE M., BACK J., WOOD R. Validation of European Community methods for microbiological and chemical analysis of raw and heat-treated milk. *J. Assoc. Public Anal.* 1993, **29** pp. 1–32
- [6] DAHMS S., & WEISS H. Estimation of precision values for microbiological reference methods: Standardized pour plate technique. *Milchwissenschaft.* 1988, **53** pp. 555–559
- [7] World Data Centre for Microorganisms. Reference strain catalogue pertaining to organisms for performance testing culture media. Available (viewed 2013-03-06) at: [http://www.wfcc.info/pdf/WDCM\\_Reference\\_Strain\\_Catalogue.pdf](http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf)

## Anexo IX – Resultados das Análises Camas de Areia realizadas pelo LMV



### Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835079      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-29 14:06:12      Data da Colheita: 2018-11-29 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-04 10:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requilitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Camas/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Sim  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:      Data de início das análises: 2018-11-29 15:30:00      Data de conclusão das análises: 2018-12-03

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telf.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de Areia - CA0 (18348770)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UPC/zaragata	-	-	4,3x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UPC/zaragata	-	-	3,3x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UPC/zaragata	-	-	2,5x10 <sup>7</sup>

Apreensão: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, não indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral da sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P.º Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almôster STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835079 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835079      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-29 14:06:12      Data da Colheita: 2018-11-29 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-04 10:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Camas/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carço      M.V. Contacto:      Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante/ Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Sim  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-11-29 15:30:00      Data de conclusão das análises: 2018-12-03

### Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/DIº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telf.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

### Micrrobiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de Areia - CA1 (18348771)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/gramatos	-	-	3,4x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/gramatos	-	-	2,7x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/gramatos	-	-	1,8x10 <sup>7</sup>

Apreensão: -

#### Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT - Índice interno método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>1</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GIQ em 30-12-2018

Página 1/1

ID Ent.:1835079 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835185 Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-12-03 12:30:28 Data da Colheita: 2018-11-02 15:40:00  
Data de Emissão: 2018-12-07 09:58:11 Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem: N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant Contacto: Data Validade:  
Lote: Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita: Espécie Animal: Bovinos Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo M.V. Contacto: Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante / Método: Sintomas: Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-12-03 15:00:00 Data de conclusão das análises: 2018-12-06

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno n.º11 RC/Drº Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.: Telf.: 913795218 Fax.: e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de Areia CA2 - 16:40 (18348266)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/3angalia	-	-	2,8x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/3angalia	-	-	1,2x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/3angalia	-	-	2,6x10 <sup>4</sup>

Aprovação: —

Legenda:

n.a - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias (T.m.m indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Alaiala - 2005-110 Almóster STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.: 1835185 ::



## Relatório de Ensaios

**Entrada N.º:** 1835648  
**Data de Entrada:** 2018-12-05 14:30:03  
**Data de Emissão:** 2018-12-11 12:06:03  
**M. de Amostragem:**

**Tipo de Análise:** Controlo Ambiental  
**Data da Colheita:** 2018-12-05 12:50:00  
**Resp. pela Colheita:** João Vaillant (Cliente)  
**N.º de Amostras:** 1

**Requisitante:** João Maria Homem Vaillant

**Nome/Formador/Código:** João Maria Homem Vaillant  
**Lote:**  
**Temp. de Colheita:**  
**M.V. Responsável:** Dr. João Carozo  
**Desinfetante / Método:**  
**Qualidade da amostra:** Conforme  
**Data de início dos ensaios:** 2018-12-05 17:00:00

**Contacto:**  
**Origem/Tipo de Amostra:** Carnes/ Botas  
**Espécie Animal:** Bovinos  
**M.V. Contacto:**  
**Sintomas:**  
**Lab. Subcontratado:**

**Data Validade:**  
**Porto de Colheita:**  
**Idade:**  
**Higieneção/ Tratamento:**  
**Transporte LMV:** Não

**Data de conclusão dos ensaios:** 2018-12-10

**Cliente a Facturar:**

**Nome:** João Maria Homem Vaillant  
**Morada:** Campo Pequeno nº11 RC/Drº  
**Telf.:** Telf.: 913795218  
**Fax.:**

**N.º Contribuinte:** 257200495  
**Cod. Postal:** 1000-078 Lisboa  
**e-Mail:** joao\_vaillant\_66@hotmail.com

**Microbiologia Clínica e Ambiental**

**AMOSTRA:** Cama Areia CA8 - 18:00 (18352882)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostras	-	-	2,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/amostras	-	-	1,4x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostras	-	-	>3,0x10 <sup>6</sup>

**Aprovação:** -

**Legenda:**

n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral da sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

**Validado por:**

Tânia Nunes  
P<sup>a</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
( Ana Cardoso )

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sarrateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835648 ::



## Relatório de Ensaio

**Entrada N.º:** 1836106 **Tipo de Análise:** Controlo Ambiental  
**Data de Entrada:** 2018-12-07 13:04:16 **Data da Colheita:** 2018-12-07 12:00:00  
**Data de Emissão:** 2018-12-11 12:10:21 **Resp. pela Colheita:** João Vaillant (Cliente)  
**M. de Amostragem:** **N.º de Amostras:** 1

**Requisitante:** João Maria Homem Vaillant

**Nome/Fornecedor/Código:** João Maria Homem Vaillant **Contacto:** **Data Validade:**  
**Lote:** **Origem/Tipo de Amostra:** Camas/ Botes **Ponto de Colheita:**  
**Temp. de Colheita:** **Espécie Animal:** Bovinos **Idade:**  
**M.V. Responsável:** Dr. João Carajo **M.V. Contacto:** **Higiene/Tipo de Transporte:**  
**Desinfetante / Método:** **Sintomas:** **Transporte LMV:** Não  
**Qualidade da amostra:** Conforme **Lab. Subcontratado:**  
**Data de início das análises:** 2018-12-07 17:00:00 **Data de conclusão das análises:** 2018-12-10

**Cliente a Facturar:**

**Nome:** João Maria Homem Vaillant **N.º Contribuinte:** 257200495  
**Morada:** Campo Pequeno nº11 RC/Diº **Cod. Postal:** 1000-078 Lisboa  
**Telf.:** **Telm.:** 913795218 **Fax.:** **e-Mail:** joao\_vaillant\_66@hotmail.com

**Microbiologia Clínica e Ambiental**

**AMOSTRA:** Cama de Areia - CA4 12:00 (1836882)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,0x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,3x10 <sup>6</sup>

**Apreiação:** -

**Legenda:**

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita da amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

**Validado por:**

Tânia Nunes  
P<sup>1</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

*Tânia Nunes*

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1836106 ::

## Anexo X – Resultados das Análises Camas Orgânicas realizadas pelo LMV



### Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1834745      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-26 17:59:15      Data da Colheita: 2018-11-26 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-03 12:44:55      Resp. pela Colheita: Cliente (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código:      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higienização/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-11-27 10:00:00      Data de conclusão das análises: 2018-11-30

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno n.º11 RC/Drº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telex: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Orgânica 0 (18843725)

Determinação	Método	Unidade/c	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	7,9x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,9x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,6x10 <sup>7</sup>

Apreciação: —

Legenda:

n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P.º Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1834746 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1834746      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-26 17:59:15      Data da Colheita: 2018-11-26 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-03 12:44:55      Resp. pela Colheita: Cliente (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código:      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carozo      M.V. Contacto:      Higiénização/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:      Data de início de análise: 2018-11-27 10:00:00      Data de conclusão de análise: 2018-11-30

### Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno n.º11 RC/Di.º      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telf.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

### Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Orgânica 1 (18343728)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,7x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	8,6x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,5x10 <sup>7</sup>

Apresiação: —

#### Legenda:

n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral da sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P.º Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835079      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
 Data de Entrada: 2018-11-29 14:06:12      Data da Colheita: 2018-11-29 10:30:00  
 Data de Emissão: 2018-12-04 10:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
 M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
 Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
 Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
 M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higienação/ Tratamento:  
 Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Sim  
 Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
 Data de início das análises: 2018-11-29 15:30:00      Data de conclusão das análises: 2018-12-03

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
 Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
 Telf.:      Telem.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Orgânica - CO2 (18348772)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/gramas	-	-	6,2x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/gramas	-	-	5,0x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/gramas	-	-	>3,0x10 <sup>7</sup>

Apreiação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
 P<sup>a</sup> Responsável Técnica de  
 Microbiologia Clínica e Ambiental  
 (Ana Cardoso)

*Tânia Nunes*

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar das Sornateiras - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
 Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835079 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835185 Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-12-03 12:30:28 Data da Colheita: 2018-11-02 15:40:00  
Data de Emissão: 2018-12-07 09:58:11 Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem: N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant Contacto: Data Validade:  
Lote: Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Bobas Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita: Espécie Animal: Bovinos Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo M.V. Contacto: Higiene/Tipo de Tratamento:  
Desinfetante / Método: Sintomas: Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme Lab. Subcontratado:  
Data de início dos ensaios: 2018-12-03 15:00:00 Data de conclusão dos ensaios: 2018-12-06

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.: Telf.: 913795218 Fax.: e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Orgânica CO3 - 18:00 (18348264)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/gramatga	-	-	4,2x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/gramatga	-	-	2,8x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/gramatga	-	-	2,7x10 <sup>6</sup>

Apreiação: -

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT - não indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835185 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835648 Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-12-05 14:30:03 Data da Colheita: 2018-12-05 12:50:00  
Data de Emissão: 2018-12-11 12:06:03 Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem: N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant Contacto: Data Validade:  
Lote: Origem/Tipo de Amostra: Camas/ Botas Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita: Espécie Animal: Bovinos Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo M.V. Contacto: Higiénia/ Tratamento:  
Desinfetante / Método: Sintomas: Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-12-05 17:00:00 Data de conclusão das análises: 2018-12-10

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.: Telf.: 913795218 Fax.: e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama Orgânica CO 4 - 12:50 (18362880)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostras	-	-	2,6x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/amostras	-	-	1,5x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostras	-	-	6,0x10 <sup>6</sup>

Aprovação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; (T)non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835648 ::

## Anexo XI – Resultados das Análises Camas de Borracha realizadas pelo LMV



### Relatório de Ensaio

Entrada N.º: 1834746      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-26 17:59:15      Data da Colheita: 2018-11-26 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-03 12:44:55      Resp. pela Colheita: Cliente (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código:      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Camas/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higienização/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-11-27 10:00:00      Data de conclusão das análises: 2018-11-30

#### Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno n.º11 RC/Di.º      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telfm.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

#### Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de borraoia 0 (18343723)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico*		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,7x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,3x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	>3,0x10 <sup>7</sup>

Aprovação: —

#### Legenda:

n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT,non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é da responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, emitido de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados refletem-se exclusivamente aos itens analisados.

#### Validado por:

Tânia Nunes  
P.º Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV382.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1834746 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1834746      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-26 17:59:15      Data da Colheita: 2018-11-26 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-03 12:44:55      Resp. pela Colheita: Cliente (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código:      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higiene/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-11-27 10:00:00      Data de conclusão de análises: 2018-11-30

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Teif.:      Teifm.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de borraoia 1 (18343724)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,5x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	8,7x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,3x10 <sup>7</sup>

Apreciação: —

Legenda:

n.s. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalaia - 2005-110 Almoester BTR  
Teif: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1834746 ::



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835079      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-11-29 14:06:12      Data da Colheita: 2018-11-29 10:30:00  
Data de Emissão: 2018-12-04 10:16:00      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requisitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Formador/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higienação/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Sim  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-11-29 15:30:00      Data de conclusão das análises: 2018-12-03

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno n.º11 RC/Dr.º      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Telf.:      Telex: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de Borracha - CB2 (18348773)

Determinação	Método	Unidade/c	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/parageta	-	-	7,7x10 <sup>4</sup>
Contagem de Escheria coli	Método Interno	UFC/parageta	-	-	7,1x10 <sup>4</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/parageta	-	-	>3,0x10 <sup>7</sup>

Aprovação: —

Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, não indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens analisados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P.º Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalala - 2005-110 Almoester STR  
Telf: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835079 ::



## Relatório de Ensaios

**Entrada N.º:** 1835185 **Tipo de Análise:** Controlo Ambiental  
**Data de Entrada:** 2018-12-03 12:30:28 **Data da Colheita:** 2018-11-02 15:40:00  
**Data de Emissão:** 2018-12-07 09:58:11 **Resp. pela Colheita:** João Vaillant (Cliente)  
**M. de Amostragem:** **N.º de Amostras:** 1

**Requisitante:** João Maria Homem Vaillant

**Nome/Fornecedor/Código:** João Maria Homem Vaillant **Contacto:** **Data Validade:**  
**Lote:** **Origem/Tipo de Amostra:** Carnes/ Botas **Ponto de Colheita:**  
**Temp. de Colheita:** **Espécie Animal:** Bovinos **Idade:**  
**M.V. Responsável:** Dr. João Carajo **M.V. Contacto:** **Higiene/ Tratamento:**  
**Desinfetante / Método:** **Sintomas:** **Transporte LMV:** Não  
**Qualidade da amostra:** Conforme **Lab. Subcontratado:**  
**Data de início da análise:** 2018-12-03 15:00:00 **Data de conclusão da análise:** 2018-12-06

**Cliente a Facturar:**

**Nome:** João Maria Homem Vaillant **N.º Contribuinte:** 257200495  
**Morada:** Campo Pequeno nº11 RC/Drº **Cod. Postal:** 1000-078 Lisboa  
**Telf.:** **Telm.:** 913795218 **Fax.:** **e-Mail:** joao\_vaillant\_66@hotmail.com

### Microbiologia Clínica e Ambiental

**AMOSTRA:** Cama de Borracha CB3 - 18-15 (18348268)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	2,5x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	1,8x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	2,0x10 <sup>6</sup>

**Apreciação:** —

#### Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias (7,000 índice método interno do Laboratório. A colheita da amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral da sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)



## Relatório de Ensaios

Entrada N.º: 1835648      Tipo de Análise: Controlo Ambiental  
Data de Entrada: 2018-12-05 14:30:03      Data da Colheita: 2018-12-05 12:50:00  
Data de Emissão: 2018-12-11 12:06:03      Resp. pela Colheita: João Vaillant (Cliente)  
M. de Amostragem:      N.º de Amostras: 1

Requilitante: João Maria Homem Vaillant

Nome/Fornecedor/Código: João Maria Homem Vaillant      Contacto:      Data Validade:  
Lote:      Origem/Tipo de Amostra: Carnes/ Botas      Ponto de Colheita:  
Temp. de Colheita:      Espécie Animal: Bovinos      Idade:  
M.V. Responsável: Dr. João Carajo      M.V. Contacto:      Higiene/ Tratamento:  
Desinfetante / Método:      Sintomas:      Transporte LMV: Não  
Qualidade da amostra: Conforme      Lab. Subcontratado:  
Data de início das análises: 2018-12-05 17:00:00      Data de conclusão de análise: 2018-12-10

Cliente a Facturar:

Nome: João Maria Homem Vaillant      N.º Contribuinte: 257200495  
Morada: Campo Pequeno nº11 RC/Drº      Cod. Postal: 1000-078 Lisboa  
Teif.:      Teifm.: 913795218      Fax.:      e-Mail: joao\_vaillant\_66@hotmail.com

### Microbiologia Clínica e Ambiental

AMOSTRA: Cama de borraoia CB4 - 18:10 (18362891)

Determinação	Método	Unidades	Valor Paramétrico *		Resultado
			Satisfatório	Não Satisfatório	
Contagem de bactérias coliformes	Método Interno	UFC/amostra	-	-	6,0x10 <sup>6</sup>
Contagem de Escherichia coli	Método Interno	UFC/amostra	-	-	5,4x10 <sup>6</sup>
Contagem de microrganismos a 30 °C	Método Interno	UFC/amostra	-	-	3,1x10 <sup>6</sup>

Apreciação: —

#### Legenda:

n.a. - Não aplicável; UFC - Unidades Formadoras de Colónias; IT, non indica método interno do Laboratório. A colheita de amostra é de responsabilidade do cliente. Relatório de Ensaio, assinado de forma digital por Tânia Nunes. A reprodução deste documento é permitida apenas sob a forma de uma cópia integral de sua informação. Os resultados apresentados referem-se exclusivamente aos itens ensaiados.

Validado por:

Tânia Nunes  
P<sup>o</sup> Responsável Técnica de  
Microbiologia Clínica e Ambiental  
(Ana Cardoso)

LMV - Laboratório de Medicina Veterinária - Lugar da Sornateira - Atalala - 2005-110 Almoester STR  
Teif: 243491797 - Fax: 243491277 - e-Mail: geral@lmv.pt - http://www.lmv.pt - NIPC: 502646551

LMV392.02 Emitido por GQ em 30-12-2016

Página 1/1

ID Ent.:1835648 ::