

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ESCOVAS MECÂNICAS NAS ROTINAS DE PRÉ-ORDENHA  
NA CONTAGEM BACTERIANA DA PELE DOS TETOS

MANUEL GUILHERME DE OLIVEIRA

ORIENTADOR(A):  
Dr Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

COORIENTADOR(A):  
Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2025

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ESCOVAS MECÂNICAS NAS ROTINAS DE PRÉ-ORDENHA  
NA CONTAGEM BACTERIANA DA PELE DOS TETOS

MANUEL GUILHERME DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor George Thomas Stilwell

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
de Oliveira

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR(A):

Dr Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

COORIENTADOR(A):

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Manuel Guilherme de Oliveira

Título da Tese ou Dissertação: Efeito da Utilização de Escovas Mecânicas nas Rotinas de Pré-ordenha na Contagem Bacteriana da Pele dos Tetos

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2025

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- 1.** É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de            julho            de 2025

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Manuel Guilherme de Oliveira

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Ricardo Bexiga, parte fundamental deste trabalho, pelo apoio, disponibilidade, brio e dedicação ao longo deste último ano.

Aos Drs. Dário Guerreiro e André Parada, por tudo aquilo que me ensinaram ao longo do estágio, pelo companheirismo e disponibilidade sempre presentes e por engrandecerem esta profissão tão bonita.

Ao Dr. João Catarino, pelo conhecimento transmitido e pela confiança, paciência e amizade demonstradas desde o primeiro dia.

À Raquel Silva, pela simpatia de todos os dias, por descomplicar a minha vida no laboratório e pelo apoio indispensável ao longo do projeto. À Diana Gomes, pelo apoio ao longo de todo o trabalho prático. Ao Prof. Gonçalo Pereira, pela ajuda na análise estatística.

Aos meus pais, para quem todas as palavras são curtas para descrever aquilo que sempre fizeram por mim. Obrigado por todo o amor e paciência, por correrem comigo atrás dos meus sonhos e por serem o melhor modelo para me guiar enquanto cresço diariamente. Se hoje olho para trás com grande orgulho no percurso que fiz, é a vocês que o devo. Obrigado por fazerem de mim quem sou hoje.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, por me fazerem rir todos os dias e por me incutirem um novo sentido de responsabilidade, que levo para o resto da vida.

Aos meus avós, por serem uma parte essencial da minha vida, por fazerem de mim um eterno apaixonado pelo campo e mundo rural e por serem os grandes responsáveis por ter escolhido este caminho.

À Inês, a peça que completa o meu puzzle. Obrigado pelo incansável apoio e inesgotável amor, por me fazeres sonhar mais alto e querer ser sempre melhor e por seres Casa. Sem ti, nenhuma destas vitórias teria um sabor tão doce.

Ao Guilherme e à Cláudia, os meus maiores companheiros nesta longa mas tão bonita viagem. Obrigado por estarem aqui desde o primeiro dia e por fazerem parte de tantas memórias bonitas, sinto-me um sortudo por ser vosso amigo.

Ao Henrique, João, Gabriel, Gonçalo, Rita, Carolina, Cláudia, Mariana, Carlota e Márcia, por serem uma parte tão importante deste percurso e por se terem tornado amigos que agora tenho a sorte de levar para o resto da vida.

A todos aqueles que, já nomeados ou não, me fizeram dar razão a quem sempre disse que “a faculdade são os melhores anos da nossa vida” e a quem sempre tratou a FMV por “esta Casa”, expressões que de início estranhei mas que, ao longo destes 6 anos, foram ganhando um outro sentido. Levo as memórias comigo, e espero do fundo do coração que continuem a fazer parte desta bonita caminhada.

A todos vocês, que me fazem sentir a pessoa mais sortuda do mundo, o meu Obrigado.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa ao estudo “Effect of mammary gland pre-milking routines using brushes on bacterial counts in teat skin”.



# EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ESCOVAS MECÂNICAS NAS ROTINAS DE PRÉ-ORDENHA NA CONTAGEM BACTERIANA DA PELE DOS TETOS

## Resumo

As mastites representam uma das principais causas de perdas económicas nas explorações leiteiras, sendo a sua prevenção importante na saúde do úbere e na qualidade do leite. A higienização dos tetos antes da ordenha constitui uma medida central no seu controlo, tendo a introdução de escovas mecânicas para limpeza dos tetos surgido como uma alternativa automatizada e uniformizadora às rotinas convencionais. Este sistema combina a fricção rotativa das escovas com a aplicação de desinfetante, seguida da secagem dos tetos.

A presente dissertação teve como objetivo principal avaliar a eficácia das escovas mecânicas na redução da carga bacteriana da pele dos tetos. O estudo foi realizado em três explorações leiteiras com protocolos de higienização distintos. Nas explorações A e B a preparação dos tetos incluía um *pre-dipping* com desinfetante à base de iodo antes da utilização das escovas mecânicas, enquanto na exploração C a higienização era feita exclusivamente com escovas. Em cada exploração foram amostrados os tetos de 20 vacas em lactação através da realização de zaragatoas cutâneas antes e após a higienização (realizada por diferentes ordenhadores). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo Teste (submetido ao protocolo habitual da exploração) e grupo Controlo (com aplicação de desinfetante à base de iodo e secagem manual). As contagens bacterianas foram realizadas em Trypticase Soy Agar (contagem total) e agar de MacConkey (enterobactérias), com avaliação da redução logarítmica das unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) após 48 horas de incubação a 37 °C. Verificou-se uma redução significativa da carga bacteriana em todos os grupos, independentemente do protocolo ou exploração. No entanto, apenas na exploração A (para ambos os indicadores microbiológicos) e na exploração B (para enterobactérias) a utilização das escovas mecânicas demonstrou uma eficácia significativamente superior à do protocolo convencional. Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na eficácia de higienização com escovas entre os diferentes ordenhadores de cada exploração, apesar de não se verificar uma maior homogeneidade dos resultados em relação ao protocolo convencional. Os resultados obtidos sugerem que a combinação de *pre-dipping* com a utilização das escovas mecânicas potencia a sua eficácia, não se identificando diferenças significativas entre os dois métodos quando utilizados de forma isolada. A elevada variabilidade operacional entre as explorações avaliadas sublinha a necessidade de estudos adicionais, com maior dimensão amostral e inclusão de outras variáveis, de modo a consolidar a evidência científica relativamente a esta tecnologia.

**Palavras-chave:** Tetos, Ordenha, Higiene do Leite, Desinfecção, Contagem Bacteriana

# EFFECT OF MAMMARY GLAND PRE-MILKING ROUTINES USING BRUSHES ON BACTERIAL COUNTS IN TEAT SKIN

## Abstract

Mastitis remains one of the main causes of economic losses in dairy farming, with its prevention being essential for udder health and milk quality. Teat cleaning prior to milking plays a central role in mastitis control, and the introduction of mechanical brushes for teat cleaning has emerged as an automated and standardizing alternative to conventional routines. This system combines the rotating friction of the brushes with the application of disinfectant, followed by teat drying.

The main objective of this dissertation was to evaluate the efficacy of mechanical brushes in reducing the bacterial load on teat skin. The study was conducted in three dairy farms with distinct hygiene protocols. In farms A and B, teat preparation included a pre-dipping with iodine-based disinfectant before the use of mechanical brushes, whereas in farm C the cleaning was performed exclusively using brushes. On each farm, teats from 20 lactating cows were sampled by cutaneous swabbing before and after hygiene procedures (performed by different milkers). Animals were divided into two groups: the Test group (subjected to the farm's usual protocol) and the Control group (treated with iodine-based disinfectant and manual drying). Bacterial counts were performed using Trypticase Soy Agar (total count) and MacConkey agar (enterobacteria), with evaluation of the logarithmic reduction in colony-forming units per millilitre (CFU/mL) after 48 hours of incubation at 37 °C. A significant reduction in bacterial load was observed in all groups, regardless of the protocol or farm. However, only in Farm A (for both microbiological indicators) and in Farm B (for enterobacteria) did the use of mechanical scrubbers show significantly higher efficacy than the conventional protocol. No statistically significant differences were found in hygiene efficacy among the different milkers within each farm when using scrubbers, although no greater homogeneity of results was observed compared to the conventional method. The results suggest that combining pre-dipping with the use of mechanical scrubbers enhances their efficacy, whereas no significant differences were identified between the two methods when used independently. The high operational variability among the evaluated farms highlights the need for further studies, with larger sample sizes and inclusion of additional variables, in order to consolidate the scientific evidence regarding this technology.

**Keywords:** Teats, Milking, Dairy Hygiene, Disinfection, Bacterial Counting

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Índice de Tabelas .....	ix
Índice de Gráficos .....	x
Índice de Figuras .....	xi
Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas .....	xii
1. Introdução.....	1
2. Relatório de Estágio .....	2
2.1 Atividades desenvolvidas no Laboratório .....	3
3. Revisão Bibliográfica .....	4
3.1. Fisiologia da glândula mamária .....	4
3.1.1. Secreção e ejeção do leite.....	4
3.1.2. Defesa da glândula mamária.....	5
3.2. Mastite .....	6
3.2.1. Patogénese .....	6
3.2.2. Etiologia .....	6
3.2.3. Tipos .....	7
3.2.4. Diagnóstico .....	8
3.2.5. Terapêutica .....	9
3.2.6. Controlo .....	10
3.3. Rotinas convencionais de ordenha .....	11
3.3.1. Métodos convencionais de preparação dos tetos .....	11
3.3.2. Importância da preparação dos tetos .....	14
3.4. Uso de escovas mecânicas na ordenha .....	16
3.4.1. Características e função das escovas mecânicas .....	16
3.4.2. Vantagens e desafios das escovas mecânicas .....	18
4. Materiais e Métodos .....	20
4.1. Objetivos do estudo .....	20
4.2. Caracterização das explorações.....	20
4.2.1. Salas e equipas de ordenha .....	20
4.2.2. Rotinas de preparação dos tetos .....	21

4.2.3. Instalações.....	22
4.3. Colheita de amostras .....	22
4.4. Validação do neutralizador e do método .....	23
4.5. Processamento de amostras .....	24
4.6. Análise estatística .....	26
5. Resultados .....	28
5.1. Quantificação bacteriana em função dos protocolos de higienização .....	28
5.1.1. Contagem de microrganismos totais após 48 horas de incubação.....	28
5.1.2. Contagem de Enterobacteriaceae após 48 horas de incubação.....	30
5.1.3 Quantificação bacteriana após 24 horas de incubação .....	32
5.2. Quantificação bacteriana em função dos ordenhadores.....	33
6. Discussão .....	35
7. Conclusão.....	40
8. Referências Bibliográficas .....	41
9. Anexos .....	47
Anexo I - Resultados das Validações .....	47
Anexo II - Resumo da Estatística Descritiva.....	48
Anexo III - Resultados.....	50

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Caracterização das explorações.....	21
Tabela 2: Medianas das quantificações e reduções microbianas logarítmicas totais ...	28
Tabela 3: Medianas das quantificações e reduções logarítmicas de enterobactérias... 31	
Tabela 4: Distribuição das amostras do grupo Teste pelos diferentes ordenhadores de cada exploração.....	33
Tabela 5: Medianas das reduções microbianas logarítmicas de cada ordenhador .....	34
Tabela 6: Validação da ausência de toxicidade do 1º lote de neutralizador .....	47
Tabela 7: Validação da eficácia de neutralização do 1º lote de neutralizador .....	47
Tabela 8: Validação da ausência de toxicidade do 2º lote de neutralizador .....	47
Tabela 9: Validação da eficácia de neutralização do 2º lote de neutralizador .....	47
Tabela 10: Estatística descritiva dos resultados após 24 horas de incubação.....	48
Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados após 48 horas de incubação.....	49
Tabela 12: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação bacteriana total) .....	53
Tabela 13: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação de enterobactérias).....	53
Tabela 14: Testes estatísticos utilizados na comparação das explorações .....	53
Tabela 15: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação bacteriana total) .....	53
Tabela 16: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação de enterobactérias).....	54
Tabela 17: Testes estatísticos utilizados na comparação das explorações .....	54
Tabela 18: Testes estatísticos utilizados na comparação da eficácia de higienização dos diferentes ordenhadores de cada exploração .....	54

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica total - pré-higienização ....	29
Gráfico 2: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica total - pós-higienização....	29
Gráfico 3: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana total .....	30
Gráfico 4: Gráfico box-plot da quantificação logarítmica de enterobactérias - pré-higienização	31
Gráfico 5: Gráfico box-plot da quantificação logarítmica de enterobactérias - pós-higienização .....	31
Gráfico 6: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação de enterobactérias.....	32
Gráfico 7: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pré-higienização em meio TSA .....	50
Gráfico 8: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pós-higienização em meio TSA .....	50
Gráfico 9: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana em meio TSA .	51
Gráfico 10: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pré-higienização em meio MCK.....	51
Gráfico 11: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pós-higienização em meio MCK.....	52
Gráfico 12: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana em meio MCK .....	52

## Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura da unidade de limpeza. Adaptado de Northern Dairy Equipment LTD Brochure ([date unknown]).....	17
Figura 2: Utilização das escovas mecânicas na higienização dos tetos (GEA Brochure 2023).....	18
Figuras 3A e 3B: Placas com meios de cultura TSA (3A) e MacConkey (3B) após 48 horas de incubação (fotos originais) .....	25

## Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

ác. – ácido

CCS – Contagem de Células Somáticas

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

log<sub>10</sub> – Logaritmo de base 10

MCK – MacConkey Agar

mL – Mililitro(s)

NaCl – Cloreto de Sódio

NMC – National Mastitis Council

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

ppm – Partes por Milhão

TSA – Trypticase Soy Agar

TSB – Trypticase Soy Broth

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colónias por Mililitro

μL – Microlitro(s)

°C – Graus Celsius

## 1. Introdução

A presente dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e tem como principal objetivo avaliar a capacidade das escovas mecânicas de contribuir para a redução da contagem microbiana na pele dos tetos. Mais concretamente, pretende-se comparar a sua utilização na forma convencional (com aplicação do desinfetante apenas durante o funcionamento da escova) e em associação a um *pre-dipping* em relação ao protocolo convencional de higienização dos tetos antes da ordenha (com aplicação de desinfetante à base de iodo e secagem manual), além de identificar possíveis diferenças na redução da carga microbiana na pele dos tetos entre diferentes ordenhadores.

A dissertação inicia-se com a apresentação do relatório de estágio, seguindo-se uma revisão da literatura sobre os temas relevantes para o estudo. Posteriormente, são descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos. Por fim, a discussão, para avaliação dos dados adquiridos em relação ao descrito na literatura, e as conclusões, onde se sintetizam as principais ideias e implicações do estudo.

## 2. Relatório de Estágio

O estágio curricular foi realizado na clínica Sá Guerreiro Vet, sob a supervisão do Dr. Dário Guerreiro e do Dr. André Parada, entre 9 de setembro de 2024 e 27 de dezembro de 2024, totalizando aproximadamente 800 horas. A atividade médico-veterinária decorreu sobretudo no distrito de Setúbal, mas foram também prestados serviços nos distritos de Lisboa, Santarém, Évora e Beja. O foco principal do estágio foi a clínica e reprodução de ruminantes domésticos, sobretudo bovinos (tanto de aptidão carne como leite), com contacto ocasional com a clínica de carnívoros domésticos, equídeos, suínos, leporídeos e camelídeos.

Na área da clínica, a casuística mais frequentemente observada incluiu pneumonias e diarreias neonatais, além de outras situações como metrites pós-parto, timpanismos, mastites, queratoconjuntivites infecciosas, retenções placentárias, cetoses, toxémias de gestação, patologias podais, tratamento de feridas, lacerações e abscessos e eutanásias. O autor participou na anamnese, exame clínico e discussão dos casos, bem como na realização da terapêutica adequada. Além disso, foram também realizadas necrópsias com o intuito de descobrir a causa da morte ou a patologia que promoveu a decisão de eutanasiar o animal.

Na área da cirurgia, a casuística mais frequente foi a correção de deslocamento de abomaso à esquerda com recurso à técnica de piloro-omentopexia com acesso pelo flanco direito. Além desta, o autor participou e auxiliou também em outras diversas intervenções cirúrgicas, tais como cesarianas, orquiectomias, correção de prolapsos vaginais ou uterinos, descornas e sutura de feridas e lacerações.

Na área da reprodução e obstetrícia, os serviços prestados centraram-se na realização de diagnósticos de gestação e avaliações da saúde uterina com recurso a palpação retal e ultrassonografia transretal, além de assistência a partos distócicos e realização de manobras obstétricas, controlo farmacológico do ciclo éstrico, inseminação artificial e exames andrológicos.

No âmbito da sanidade e medicina profilática, foram realizadas atividades de carácter sanitário em conjunto com os Agrupamentos de Defesa Sanitária da Península de Setúbal e de Coruche, como parte dos programas oficiais de controlo e erradicação de tuberculose e brucelose nos bovinos, nomeadamente testes da intradermotuberculização comparada, com leitura da reação 72 horas após a inoculação das tuberculinas, e colheita de sangue para testagem de brucelose. Foram também efetuadas ações de identificação de animais com recurso a brincos ou bolos ruminais, desparasitações e vacinações (para, por exemplo, clostridiose, Língua Azul, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina viral e vírus sincicial bovino).

Para além das situações descritas nos ruminantes, incluem-se também nas atividades realizadas durante o estágio a clínica de carnívoros domésticos, equídeos, suínos, leporídeos

e camélídeos, cuja casuística incluiu situações como pneumonias, diarreias, claudicações, hipocalcémias pós-parto ou eutanásias, além de vacinação e desparasitação destas espécies e identificação de canídeos e equídeos com recurso ao chip de identificação eletrónica.

No decorrer destas atividades, o autor teve a oportunidade não só de aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, como a realização de história clínica e exames complementares, desenvolvimento de raciocínio diagnóstico, cálculo de doses, realização de fluidoterapia, administração de medicamentos, auxílio em práticas cirúrgicas e de necrópsia, processo de identificação dos animais e preenchimento de fichas técnicas, mas também de desenvolver competências práticas fundamentais, como o pensamento clínico e o espírito crítico inerentes à profissão.

## **2.1 Atividades desenvolvidas no Laboratório**

O desenvolvimento da componente prática deste estudo implicou a realização de todas as fases laboratoriais associadas ao processamento microbiológico das amostras, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), totalizando cerca de 120 horas.

Inicialmente procedeu-se à validação do neutralizador incorporado nas amostras colhidas após a higienização dos tetos de forma a assegurar a inibição da atividade residual dos desinfetantes aplicados na pele e, assim, evitar a continuação do seu efeito bactericida após a colheita. Seguiu-se a preparação dos meios de transporte e conservação e dos meios de cultura utilizados na sementeira das amostras. Após a colheita as amostras foram sujeitas a homogeneização e diluições seriadas de base 10, com posterior inoculação segundo o método de microgota e após a incubação das placas durante 24 e 48 horas a 37 °C procedeu-se à contagem e registo do número de colónias em cada diluição.

A participação ativa neste processo permitiu ao autor aprofundar competências laboratoriais na área da microbiologia veterinária, consolidando conhecimentos práticos sobre métodos de colheita, conservação, cultura e quantificação bacteriana, bem como sobre o rigor metodológico exigido para garantir a validade de um estudo experimental.

### **3. Revisão Bibliográfica**

As mastites representam uma das principais causas de perdas económicas nas explorações leiteiras devido, por exemplo, à redução da produção e qualidade do leite, aos custos associados à terapêutica dos animais e à rejeição do leite durante a duração da antibioterapia e cumprimento do intervalo de segurança (Blowey and Edmondson 2010; Serrenho 2015; Ruegg 2020). Além disso, são o principal motivo para a utilização de antimicrobianos nestas explorações e podem representar uma ameaça à saúde pública, uma vez que podem ser responsáveis pela transmissão de agentes patogénicos ou pela veiculação de toxinas alimentares (Farrell et al. 2023; Schadt 2023). A implementação de medidas de controlo como a adoção de uma correta rotina de ordenha, a higiene do ordenhador, as boas práticas na terapêutica e o refugio dos animais persistentemente afetados tem-se mostrado essencial para controlar a incidência desta doença (Kelly et al. 2009; Constable et al. 2017).

Com a tendência atual para um aumento do número de animais por exploração, e sendo a ordenha uma das atividades mais exigentes em termos de tempo na produção leiteira, tem-se observado uma propensão para a automatização da ordenha de forma a acelerar e otimizar o processo (Barkema et al. 2015; Hogan et al. 2022). Nesse sentido, a introdução das escovas mecânicas na preparação dos tetos tornou-se uma prática relevante. Estas combinam a aplicação de desinfetante durante a escovagem e a secagem do teto com um jato de ar, permitindo uma higienização mais prática quando comparada com os métodos convencionais. Uma vez que cada uma destas ações demora apenas alguns segundos por teto, a utilização das escovas permite também uma redução significativa do tempo necessário à preparação do animal para a ordenha (Baumberger et al. 2016). No entanto, a curta duração destas ações pode resultar num tempo de contacto insuficiente do desinfetante com a pele dos tetos ou numa secagem inadequada, fatores que podem comprometer a eficácia da higienização e favorecer a introdução de agentes patogénicos na glândula mamária (Blowey and Edmondson 2010; Enger et al. 2015).

#### **3.1. Fisiologia da glândula mamária**

##### **3.1.1. Secreção e ejeção do leite**

O úbere da vaca é constituído por quatro glândulas mamárias individuais, designadas por quartos, cada uma delas terminando ventralmente num teto. Cada glândula é composta por um sistema de ductos interligados a alvéolos secretores, envolvidos por tecidos conjuntivo, muscular e adiposo e sustentados por uma cápsula fibroelástica. Todo o leite que drena para um teto é produzido exclusivamente no quarto correspondente (Blowey and Edmondson 2010; Dee Fails and Magee 2018).

A produção de leite na glândula mamária inicia-se no período de transição entre o final da gestação e o início da lactação. Este processo, denominado lactogênese, é caracterizado pelo desenvolvimento funcional dos alvéolos e é regulado por alterações hormonais como o aumento da prolactina e a redução dos níveis de progesterona. Durante a lactação, a manutenção da secreção de leite - galactopoiese - está associada a hormonas como a prolactina ou a somatotropina, além do estímulo regular da sucção do vitelo ou da ordenha (Blowey and Edmondson 2010; Dee Fails and Magee 2018).

A ejeção do leite alveolar, que pode representar 80% do volume total, ocorre como resposta a uma estimulação mecânica do úbere e dos tetos, seja pela sucção do vitelo ou pela manipulação dos ordenhadores, juntamente com estímulos visuais ou auditivos associados ao momento da ordenha (Pfeilsticker et al. 1996; Dee Fails and Magee 2018). Esta estimulação desencadeia um reflexo neuro-endócrino: uma vez que os tetos são ricamente inervados, o estímulo é rapidamente transmitido ao cérebro, induzindo a libertação de oxitocina na neuro-hipófise. Esta hormona promove a contração das células mioepiteliais que envolvem os alvéolos, levando à expulsão do leite para os ductos e destes para as cisternas da glândula e do teto. O estímulo mecânico da sucção do vitelo ou do vácuo da máquina de ordenha, aliados ao relaxamento do canal e do esfíncter do teto permitem a ejeção do leite (Blowey and Edmondson 2010; Dee Fails and Magee 2018).

### **3.1.2. Defesa da glândula mamária**

Uma vez que o canal do teto constitui a principal via de entrada para agentes patogénicos responsáveis por infeções intramamárias e considerando a frequência com que os tetos se encontram contaminados, tornou-se essencial para os animais desenvolverem mecanismos de defesa que impedissem a invasão, penetração e multiplicação de microrganismos na glândula mamária (Blowey and Edmondson 2010; Dee Fails and Magee 2018).

Tanto a pele, graças à sua integridade, queratinização e presença de ácidos gordos com ação bacteriostática, como o esfíncter circular de músculo liso localizado na terminação de cada teto, responsável pela oclusão do canal após a ordenha ou amamentação, atuam como barreiras primárias à invasão da glândula mamária. No interior do canal do teto, o próprio leite desempenha um papel importante na defesa da glândula mamária durante a sua ejeção, funcionando como um mecanismo de eliminação de potenciais microrganismos presentes nas camadas superficiais do epitélio do lúmen do canal. Além do leite, também a roseta de Furstenberg, um anel de células linfocíticas localizadas no interior do canal do teto, atua como barreira adicional contra a invasão microbiana (Blowey and Edmondson 2010).

A glândula mamária dispõe ainda de outros mecanismos de imunidade inata como a lactoferrina presente no leite, que exerce uma ação bacteriostática particularmente relevante

durante o período seco. Para além desta, também a imunidade celular, representada por exemplo pelos neutrófilos polimorfonucleares, e a imunidade humoral, sobretudo através da opsonização das bactérias de forma a promover a sua fagocitose, desempenham um papel importante na proteção da glândula mamária (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

## **3.2. Mastite**

### **3.2.1. Patogénese**

A mastite é uma doença caracterizada pela inflamação do parênquima da glândula mamária, associada a diversas alterações físicas e químicas do leite e patológicas da glândula mamária (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

A progressão das mastites desenvolve-se em três fases distintas. Num primeiro momento ocorre a invasão, caracterizada pela entrada dos agentes patogénicos na glândula mamária, geralmente através do canal do teto. Segue-se a infeção, com rápida multiplicação dos microrganismos e penetração no tecido mamário. Por fim, e como consequência das fases anteriores, a inflamação, marcada pela mobilização massiva de leucócitos, particularmente neutrófilos polimorfonucleares, para combater a infeção. (Constable et al. 2017).

A ocorrência de mastite e a sua gravidade dependem de fatores como a exposição a microrganismos e a sua virulência e a competência do sistema imunitário para responder eficazmente às agressões. Além destes, também outros como a fase da lactação, a idade do animal, a época do ano ou o grau de higiene do úbere têm influência no desenvolvimento das mastites (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

### **3.2.2. Etiologia**

As mastites resultam frequentemente da invasão e multiplicação de bactérias no interior da glândula mamária, embora outros microrganismos, como algas ou leveduras, ou até agressões físicas ou químicas possam também estar na sua origem. Dentro da etiologia bacteriana, as mastites estão normalmente associadas a dois grupos principais de agentes (Constable et al. 2017).

Os agentes contagiosos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Mycoplasma bovis*, têm como principal origem as glândulas mamárias de outros animais do efetivo e são geralmente transmitidos durante a ordenha através da partilha de panos utilizados na limpeza e secagem dos tetos, dos equipamentos de ordenha ou das mãos dos ordenhadores. Estes agentes estão frequentemente associados a mastites subclínicas de longa duração (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

Os agentes ambientais, como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., são organismos presentes no meio ambiente e que se transmitem sobretudo entre as ordenhas, por exemplo através do contacto dos tetos com camas húmidas e parques conspurcados com estrume, incorreta higienização ou secagem dos tetos antes da ordenha ou instalações que favoreçam lesões frequentes dos tetos (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Estes agentes estão normalmente associados a mastites de maior gravidade e tornam-se particularmente relevantes em explorações que adotaram programas de controlo de mastites, que reduzem a incidência de infeções provocadas por agentes contagiosos (Constable et al. 2017).

Além destes dois grupos, as mastites podem também ser provocadas por microrganismos oportunistas provenientes da microbiota normal da pele dos tetos, que invadem a glândula mamária através do canal do teto. Destes organismos, destacam-se os staphylococci coagulase-negativos e algumas espécies de *Corynebacterium* spp. (Constable et al. 2017).

### **3.2.3. Tipos**

As mastites podem ser classificadas em clínicas ou subclínicas, consoante a presença ou ausência de sinais clínicos, respetivamente (Constable et al. 2017).

As mastites clínicas caracterizam-se por alterações no leite ou pela manifestação de sinais clínicos locais ou sistémicos, permitindo a classificação da sua gravidade em três graus: ligeiras, quando se verificam apenas alterações no leite; moderadas, quando há alterações tanto no leite como na glândula mamária; graves, quando, para além das alterações no leite e na glândula mamária também existe envolvimento sistémico (Ruegg 2012). No leite podem surgir coágulos de fibrina, material purulento ou descoloração, geralmente acompanhados por uma quebra de produção marcada, especialmente se a mastite ocorrer no início da lactação. Na glândula mamária pode verificar-se tumefação, rubor ou dor à palpação, podendo evoluir para a formação de abcessos ou atrofia nos casos mais prolongados. A nível sistémico, os animais podem apresentar febre, taquicardia, taquipneia, hipomotilidade ruminal ou anorexia, podendo mesmo ocorrer a morte (Ruegg 2012; Constable et al. 2017).

As mastites subclínicas, por outro lado, não apresentam sinais clínicos evidentes nem alterações macroscópicas no leite dos quartos afetados. Estas estão associadas a quebras mais discretas na produção e só podem ser detetadas com recurso a métodos auxiliares de diagnóstico. Esta dificuldade de deteção contribui para que muitas vezes passem despercebidas nas explorações e se tornem mais prevalentes e com maior duração do que a forma clínica. Se não forem diagnosticadas e tratadas atempadamente podem evoluir para mastites clínicas (Constable et al. 2017; Fonseca et al. 2021).

As mastites podem também ser classificadas de acordo com a velocidade de progressão do quadro clínico em hiperagudas, agudas, subagudas ou crônicas, ou com a sua duração, como sendo de curta duração, recorrentes ou crônicas (Constable et al. 2017).

#### **3.2.4. Diagnóstico**

O diagnóstico das mastites clínicas é realizado com base no exame físico do animal, permitindo a identificação de alterações no leite, na glândula mamária ou sistêmicas. A detecção das mastites subclínicas implica a utilização de métodos auxiliares de diagnóstico, como o Teste Californiano de Mastites, a Contagem de Células Somáticas (CCS) ou a Condutividade Elétrica do leite. Além destes, existem também a cultura bacteriológica e os testes moleculares, ferramentas importantes na identificação do agente etiológico envolvido na mastite (Constable et al. 2017; Fonseca et al. 2021).

O Teste Californiano de Mastites permite fazer uma avaliação semi-quantitativa da Contagem de Células Somáticas do leite e é amplamente utilizado devido à sua simplicidade e baixo custo, uma vez que basta recolher um pequeno volume de leite dos quatro tetos para a respectiva placa de teste, à qual se adiciona um reagente antes de homogeneizar durante alguns segundos. O reagente contém um detergente que provoca a lise celular, reagindo com o DNA dos núcleos celulares e formando um gel. O reagente contém ainda púrpura de bromocresol, um indicador de pH que modifica a coloração da solução caso o pH do leite ultrapasse o valor fisiológico (aproximadamente 6.6), uma alteração comum nas mastites. O resultado do teste pode ser classificado como negativo, “vestigial” ou positivo, sendo este último subdividido em três categorias (de 1 a 3) de acordo com o grau de viscosidade da mistura. Quanto maior for a viscosidade da mistura, mais elevado é o resultado, indicando um aumento da CCS e um maior grau de inflamação da glândula mamária (Constable et al. 2017; Fonseca et al. 2021).

A Contagem de Células Somáticas do leite, onde se incluem leucócitos e células de descamação do epitélio glandular, é um método de grande relevância para o diagnóstico de mastites subclínicas. Em caso de inflamação há um aumento marcado desta contagem devido ao recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares como reação do tecido glandular à agressão (e à quebra da produção leiteira, que contribui para a concentração destas células). Em condições normais, os valores da CCS são inferiores a 100.000 células/mL, sendo geralmente considerado um valor de 200.000 células/mL como limiar para a detecção de mastite (Constable et al. 2017; Fonseca et al. 2021). Este teste é frequentemente aplicado no leite de tanque, permitindo monitorizar a saúde do úbere e a qualidade do leite do efetivo e representando um papel importante na valorização ou penalização do leite pela indústria (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

A Condutividade Elétrica do leite reflete as alterações nas concentrações iônicas, nomeadamente o aumento dos níveis de sódio e cloro e a redução dos níveis de potássio, características das mastites. Estas alterações são das primeiras a ocorrer no leite mastítico, permitindo uma deteção precoce da doença. Este método é especialmente útil como rotina, sendo incorporado nos sistemas de ordenha para identificar vacas que possam apresentar mastite de forma automatizada (Constable et al. 2017).

A cultura microbiológica do leite é muito utilizada na identificação do agente etiológico responsável pela mastite. De forma a evitar contaminações acidentais que possam comprometer os resultados, é essencial proceder a uma correta higienização dos tetos e à colheita assética do leite (Constable et al. 2017; Middleton et al. 2017). Uma amostra é considerada contaminada quando são isoladas três ou mais espécies distintas de bactérias em meio de cultura (Middleton et al. 2017). Os resultados da cultura microbiológica são particularmente relevantes em termos de gestão do efetivo, uma vez que permitem identificar os agentes mais prevalentes na exploração e ajustar as estratégias de tratamento e controlo (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017). A ausência de crescimento bacteriano em amostras de animais com mastite clínica não descarta a presença de um agente infeccioso: mesmo com uma colheita e cultura corretas, 15 a 40% das amostras não apresentam crescimento, o que se pode dever à presença de agentes patogénicos não bacterianos ou intracelulares, à eliminação espontânea da infeção, à baixa concentração ou excreção intermitente do agente no leite ou à presença de substâncias inibidoras no leite (Constable et al. 2017; Lago and Godden 2018).

Dos métodos moleculares, o mais utilizado é o Teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica permite um conhecimento mais aprofundado dos agentes envolvidos nas mastites. Dado o seu elevado custo, é utilizado sobretudo no leite de tanque para monitorizar os agentes mais prevalentes na exploração (Constable et al. 2017).

### **3.2.5. Terapêutica**

As decisões terapêuticas em animais com mastite dependem de fatores como os sinais clínicos apresentados e a sua gravidade, o agente patogénico envolvido, a duração da infeção, o número de quartos mamários afetados, o número de lactações, os dias em lactação e a produção leiteira, entre outros (Constable et al. 2017; de Jong et al. 2023).

Nas vacas em lactação, a utilização de antibióticos pode não ser necessária em casos de mastite clínica ligeira ou moderada. Nestes casos recomenda-se a colheita de leite e a realização de cultura bacteriológica, permitindo a avaliação dos resultados no dia seguinte para decidir se a antibioterapia é necessária (Constable et al. 2017; de Jong et al. 2023).

A terapêutica de mastites subclínicas durante a lactação justifica-se apenas em situações específicas, como infeções por *Streptococcus agalactiae*, um agente contagioso

com elevadas taxas de cura após tratamento antibiótico. O tratamento destas infeções destina-se também a prevenir a disseminação do agente na sala de ordenha (Ruegg 2021).

A escolha do antibiótico deve considerar aspetos como o agente patogénico envolvido, o perfil de sensibilidade a antibióticos e o custo e intervalo de segurança do tratamento antimicrobiano. A administração do antibiótico é geralmente feita por via intramamária; contudo, quando existe envolvimento sistémico, caso haja envolvimento de mais do que um quarto ou caso o animal seja agressivo, pode ser mais adequado realizar a administração por via parenteral (Constable et al. 2017; de Jong et al. 2023).

A utilização de anti-inflamatórios não esteróides está indicada em todos os casos de mastite clínica, pelo menos durante o primeiro dia do tratamento, com o objetivo de reduzir a dor, a febre e a inflamação e assim aumentar a ingestão de alimento e recuperar a produção leiteira (Yeiser et al. 2012; de Jong et al. 2023). Muitos casos de mastite requerem também terapêutica de suporte, incluindo administração de fluidos e correção do equilíbrio eletrolítico (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

No momento da secagem, é recomendada a terapêutica seletiva, baseada na administração de antibiótico intramamário apenas nos quartos mastíticos, com o objetivo de eliminar as infeções existentes (de Jong et al. 2023; Müller et al. 2023). A utilização de antibióticos de forma profilática, prática comum durante muitos anos, está atualmente proibida na União Europeia (European Union 2019; Müller et al. 2023). No momento da secagem deve também ser aplicado um selante em todas os quartos para prevenir novas infeções durante o período seco (Constable et al. 2017; Müller et al. 2023).

Atualmente são cada vez mais utilizadas as placas de cultura com meios seletivos e diferenciais na própria exploração como ferramenta de apoio à decisão terapêutica, de forma a promover uma utilização mais racional e direcionada dos agentes antimicrobianos em casos clínicos de mastite (Neeser et al. 2006; Lago et al. 2011). Assim, em mastites de gravidade ligeira ou moderada, recomenda-se a administração de antibióticos apenas nos casos de infeção por microrganismos Gram-positivos. Em infeções por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus uberis*, o tratamento deve ser prolongado (Lago et al. 2011; Lago and Godden 2018; de Jong et al. 2023).

### **3.2.6. Controlo**

Para além de constituírem um problema de bem-estar animal, as mastites representam uma das principais causas de perdas económicas nas explorações leiteiras. Este impacto deve-se não só aos custos associados ao tratamento, substituição dos animais refugados e mão-de-obra e maneo adicionais, mas também à quebra na produção e qualidade do leite (Ruegg 2012; Fonseca et al. 2021). Assim, a implementação de um programa de controlo de

mastites nas explorações leiteiras é fundamental para mitigar os efeitos negativos desta doença (Constable et al. 2017).

Os programas de controlo de mastites baseiam-se em 3 pilares essenciais: a eliminação das infeções existentes, seja através da terapêutica (tanto durante a lactação como no momento da secagem) ou do refugo dos tetos ou animais cronicamente afetados; a prevenção de novas infeções, graças à adoção de medidas como a higienização dos tetos antes e após a ordenha, a correta manutenção e utilização dos equipamentos de ordenha e a aplicação de selante no momento da secagem; e a monitorização da saúde do úbere, realizada através do controlo regular de parâmetros como a CCS e a incidência de mastites, permitindo avaliar a eficácia dos programas implementados e fazer ajustes ou correções quando necessário (Constable et al. 2017).

Os programas de controlo de mastites adotados nas explorações leiteiras são atualmente formados por 10 componentes principais: higiene do úbere e adoção de boas práticas de ordenha; instalação, funcionamento e manutenção apropriados do equipamento de ordenha; gestão e terapêutica das vacas secas; terapêutica adequada das mastites durante a lactação; refugo dos animais cronicamente afetados; manutenção de um ambiente limpo e adequado; registo detalhado e sistemático de dados; monitorização regular do estado de saúde do úbere do efetivo; revisão periódica do programa de gestão da saúde mamária; definição de objetivos para o estado de saúde do úbere da exploração (Constable et al. 2017). A implementação de um programa de controlo de mastites baseado nestes princípios contribui não só para a redução do impacto negativo da doença como também para a saúde e o bem-estar animal, promovendo a produção de leite de alta qualidade (Constable et al. 2017).

### **3.3. Rotinas convencionais de ordenha**

#### **3.3.1. Métodos convencionais de preparação dos tetos**

Uma rotina de ordenha correta e eficiente, realizada num ambiente limpo e por pessoas devidamente formadas, é essencial para a saúde do úbere (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013; Rodriguez et al. 2025). A adoção destas práticas visa minimizar o risco de novas infeções intramamárias e assegurar a qualidade do leite. (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013). Assim, de acordo com as recomendações do *National Mastitis Council* (2013), as explorações leiteiras devem adotar uma rotina de ordenha que inclua os seguintes passos, executados na ordem indicada:

1. Eliminação dos primeiros jatos de leite de cada quarto;
2. Aplicação do desinfetante pré-ordenha (*pre-dipping*);
3. Limpeza e secagem dos tetos;
4. Colocação e ajuste das tetinas;
5. Extração eficiente do leite;

6. Remoção das tetinas;
7. Aplicação do desinfetante pós-ordenha (*post-dipping*).

A entrada e saída dos animais na sala de ordenha (bem como todo o tempo que lá permanecem) devem ser realizadas de forma calma, evitando sons ou movimentos bruscos que possam causar stress, dor ou medo aos animais. Estes cuidados são muito importantes, uma vez que o aumento da atividade do sistema nervoso simpático decorrente destes estímulos pode comprometer o reflexo de descida do leite, prolongando o tempo de ordenha (NMC 2013; Dee Fails and Magee 2018).

A ordem de ordenha desempenha um papel relevante na minimização do risco de transmissão de infeções. A ordenha deve ser iniciada pelas vacas primíparas e pelas vacas de alta produção, seguindo-se os restantes animais. As vacas com contagens elevadas de células somáticas ou com mastites clínicas ou crónicas devem ser ordenhadas no final, prevenindo a transmissão de agentes patogénicos e a contaminação do tanque de leite com microrganismos ou resíduos de antibióticos (Blowey and Edmondson 2010; Hiley et al. [date unknown]). Após a ordenha destes animais, é fundamental proceder à higienização cuidadosa do equipamento (Blowey and Edmondson 2010).

A eliminação dos primeiros jatos de leite de cada quarto mamário destina-se a detetar alterações no leite (e na glândula mamária) que possam significar presença de mastite, além de também permitir eliminar agentes patogénicos presentes no canal do teto e estimular o reflexo de descida do leite. Os jatos devem ser descartados diretamente para o chão, evitando o contacto com as mãos ou luvas dos ordenhadores (NMC 2013; Constable et al. 2017).

O desinfetante pré-ordenha é aplicado nos tetos por imersão ou pulverização, garantindo um tempo de contacto adequado (que em muitos desinfetantes é de cerca de 30 segundos) para maximizar a sua ação bactericida (Enger et al. 2015; Breen 2019). Após a aplicação do desinfetante, os tetos devem ser limpos e secos com panos limpos ou papéis descartáveis, utilizados individualmente (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

Após a aplicação, as tetinas devem ser ajustadas imediatamente para garantir que permanecem corretamente posicionadas durante a ordenha, uma vez que o desprendimento ou ajuste inadequado das tetinas aumenta o risco de lesões nos tetos. Após a ordenha, nos sistemas que requerem remoção manual das tetinas, é muito importante desligar o vácuo do sistema de ordenha antes de as remover para evitar danificar os tetos (NMC 2013; Constable et al. 2017).

O desinfetante pós-ordenha deve ser aplicado imediatamente após a remoção das tetinas, garantindo a cobertura total e uniforme dos tetos. Este procedimento tem como objetivo eliminar microrganismos potencialmente transferidos para o teto antes que tenham

oportunidade de invadir e colonizar o canal do teto, reduzindo assim o risco de mastites causadas sobretudo por agentes contagiosos (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013). Além disso, muitos desinfetantes contêm substâncias emolientes (como a glicerina ou a lanolina) que contribuem para a manutenção da saúde e integridade da pele dos tetos ou possuem a capacidade de formar uma “barreira” protetora, permanecendo na pele dos tetos por mais tempo e promovendo uma ação prolongada (Blowey and Edmondson 2010; Breen 2019).

Após a ordenha, os animais devem ser incentivados a permanecer em estação durante 20 a 30 minutos através da disponibilização de alimento e água limpa. Este comportamento reduz a probabilidade de os tetos entrarem em contacto com as camas ou os pisos contaminados enquanto os esfíncteres ainda não estão completamente encerrados (Blowey and Edmondson 2010).

O equipamento de ordenha deve ser lavado e higienizado após cada ordenha e sujeitos a uma avaliação e manutenção regulares. A substituição de componentes desgastados deve ser realizada sempre que necessária (NMC 2013; Constable et al. 2017).

Durante a ordenha, os ordenhadores devem usar luvas descartáveis e garantir que estas permanecem limpas. Esta prática reduz o risco de transmissão de microrganismos entre animais, já que a superfície lisa das luvas permite uma higienização mais eficaz do que a pele das mãos. Sempre que estejam contaminadas ou danificadas, as luvas devem ser substituídas (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013).

A adoção de rotinas de preparação das vacas em lotes contribui para a eficiência da ordenha e assegura um intervalo de tempo adequado entre a preparação e a aplicação das tetinas, o que beneficia tanto a eficácia do desinfetante como a estimulação do reflexo de descida do leite. No modelo de ordenha territorial, o ordenhador elimina os primeiros jatos de leite e aplica o desinfetante numa vaca, repetindo este procedimento num conjunto de 8 a 10 animais; após a conclusão do lote, regressa à primeira vaca para secar os tetos e aplicar as tetinas, repetindo o processo nas restantes. Na rotina de ordenha sequencial existe uma divisão de tarefas: um dos ordenhadores é responsável pela eliminação dos primeiros jatos de leite e aplicação do desinfetante, enquanto outro seca os tetos e aplica as tetinas. (Blowey and Edmondson 2010).

A formação das equipas de ordenha é um fator determinante para o sucesso de uma exploração leiteira. O treino e instrução dos ordenhadores promovem a eficiência e a consistência da ordenha e o cumprimento das boas práticas, refletindo-se diretamente na higiene dos tetos, na saúde mamária dos animais e na qualidade do leite, além de contribuírem para a motivação e empenho das equipas (Rodrigues and Ruegg 2005; Rodriguez et al. 2025).

### **3.3.2. Importância da preparação dos tetos**

A preparação dos tetos, que inclui a eliminação dos primeiros jatos de leite, a aplicação do desinfetante pré-ordenha e a limpeza e secagem dos tetos, tem como objetivo reduzir a carga bacteriana e de matéria orgânica presente na pele dos tetos e assegurar que estes sejam ordenhados secos e limpos, minimizando o risco de mastites associadas sobretudo a agentes ambientais e promovendo simultaneamente a qualidade do leite e a eficiência da ordenha (Pankey 1989; Blowey and Edmondson 2010; Watters et al. 2012; NMC 2013).

O impacto da higienização pré-ordenha pode variar em função do contexto (Morton et al. 2014; Gleeson et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2021b). Alguns estudos indicam que a higienização pré-ordenha leva a uma redução na incidência de infecções intramamárias e de mastites clínicas em explorações onde os animais permanecem estabulados, normalmente associados a uma inferior higiene dos parques e a um maior grau de conspurcação dos úberes, o que influencia diretamente a exposição da glândula mamária a microrganismos e o risco de ocorrência de mastite (Oliver et al. 2001; Jayarao et al. 2004; Constable et al. 2017; Gleeson et al. 2018). Parece haver menor benefício da higienização pré-ordenha em explorações onde os animais estejam em regime de pastoreio e com CCS médias inferiores a 200.000 células/mL, particularmente quando a higienização pós-ordenha já é uma prática adotada (Williamson and Lacy-Hulbert 2013; Morton et al. 2014; Gleeson et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2021b). Ainda assim, independentemente do ambiente, a higienização pré-ordenha contribui para a redução da carga bacteriana na pele dos tetos e deve ser adotada em explorações com elevada pressão de infecção ambiental, onde pode reduzir a incidência de infecções intra-mamárias associadas a agentes ambientais em mais de 50% (Enger et al. 2015; Baumberger et al. 2016; Gleeson et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2021b).

A eficácia do desinfetante utilizado depende de vários fatores, nomeadamente a substância ativa e a sua concentração, o nível de higiene dos tetos (uma vez que a marcada conspurcação dos tetos com matéria orgânica pode limitar a ação germicida) e o tempo de contacto com a pele dos tetos, que em muitas substâncias não deve ser inferior a 30 segundos. Um tempo inferior pode comprometer a eficácia do desinfetante, enquanto um tempo superior reduz a eficiência da rotina de ordenha (Enger et al. 2015; Breen 2019). Além disso, também a viscosidade do produto, importante na sua aderência aos tetos, e as suas propriedades surfactantes, que permitem a penetração do desinfetante nas fissuras e ranhuras da pele, influenciam diretamente a sua ação bactericida (Blowey and Edmondson 2010).

A técnica mais eficaz de aplicação é a imersão dos tetos em desinfetante líquido ou em espuma, pois assegura uma aplicação uniforme e adequada do produto, cobrindo a totalidade dos tetos. A pulverização, apesar de mais prática, apresenta um maior risco de

cobertura incompleta e maior desperdício de produto (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017; Breen 2019).

Os desinfetantes utilizados na preparação dos tetos devem cumprir requisitos como eficácia germicida comprovada, prevenção de novas infecções intramamárias e promoção da integridade da pele dos tetos. Além disso, não devem ser irritantes para a pele dos tetos ou as mãos dos ordenhadores nem deixar resíduos prejudiciais para a saúde humana e devem ter uma ação rápida (Blowey and Edmondson 2010; Godden et al. 2016). Uma vez que os diferentes desinfetantes têm distintos níveis de eficácia sobre diferentes grupos de bactérias, é importante que a escolha do produto a utilizar na preparação dos tetos tenha em conta o perfil bacteriano da exploração (Fitzpatrick et al. 2021a). Além da eficácia, também fatores como o custo, a facilidade de aplicação e as recomendações do médico-veterinário ou de especialistas são muito importantes para o produtor no momento da decisão (Ózsvári and Ivanyos 2022).

Dentro das várias substâncias disponíveis no mercado, os iodóforos são amplamente utilizados devido à sua ação rápida e eficaz contra bactérias, vírus e fungos e pela sua coloração, que facilita a avaliação visual da cobertura dos tetos (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Para além destes, são também comuns a clorexidina pela sua eficácia antibacteriana, especialmente contra organismos Gram-positivos, e maior resistência à interferência de matéria orgânica e os desinfetantes à base de dióxido de cloro, ácido láctico, peróxido de hidrogénio, bem como as associações de diferentes substâncias ativas (Blowey and Edmondson 2010; Breen 2019; DGAV 2020).

A limpeza física e secagem dos tetos é fundamental para a redução da carga bacteriana e de matéria orgânica, permitindo também a remoção de resíduos dos desinfetantes utilizados, evitando a sua presença no leite (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017; Breen 2019). A lavagem do úbere e tetos com água é contra-indicada, uma vez que pode arrastar sujidade e microrganismos da pele do úbere para os tetos, especialmente para as suas extremidades, e para os equipamentos de ordenha, aumentando o risco de contaminação. Assim, a limpeza pré-ordenha deve ser limitada aos tetos e realizada sem recurso a água, a não ser que o úbere esteja marcadamente conspurcado (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013).

A secagem dos tetos após a higienização é um ponto essencial na rotina de ordenha (Ruegg 2004 citado por Elmoslemany et al. 2010). A ordenha dos tetos húmidos como consequência de uma secagem inadequada pode favorecer a contaminação das suas extremidades, aumentando o risco de mastites e a probabilidade de contaminação dos equipamentos de ordenha e do tanque de leite, além de também contribuir para o desprendimento das tetinas durante a ordenha (Galton et al. 1984; Blowey and Edmondson 2010; Breen 2019). A secagem deve ser realizada com panos limpos ou com papéis

descartáveis, utilizados individualmente para evitar a disseminação de agentes patogênicos entre animais (Blowey and Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

A preparação adequada dos tetos desempenha também um papel fundamental na estimulação do reflexo de descida do leite, promovido pela libertação de oxitocina (Bruckmaier and Blum 1996; Watters et al. 2012). A aplicação das tetinas 60 a 90 segundos após o início da preparação dos tetos maximiza os benefícios deste reflexo, reduzindo o tempo necessário para a extração do leite e, conseqüentemente, o risco de lesões nos tetos (Blowey and Edmondson 2010; NMC 2013).

Uma estimulação insuficiente antes da colocação da unidade de ordenha ou um intervalo de tempo demasiado curto entre a estimulação e a colocação das tetinas podem originar um fluxo de leite denominado bimodal (Weiss and Bruckmaier 2005; Fernandes et al. 2023). Este fenómeno caracteriza-se por um período de redução ou ausência temporária do fluxo de leite, que ocorre após a remoção do leite armazenado na cisterna glandular mas antes da descida do leite alveolar (Bruckmaier and Hilger 2001; Fernandes et al. 2023). Durante estes períodos de fluxo de leite reduzido ou ausente, os níveis de vácuo na extremidade do teto e no interior da glândula mamária aumentam, intensificando as forças de tração e compressão exercidas sobre os tecidos e aumentando o risco de lesão (Besier et al. 2016; Fernandes et al. 2023). O fluxo de leite bimodal pode ser evitado através da correta preparação dos tetos, assegurando uma estimulação adequada e respeitando o intervalo ideal para a aplicação das tetinas (Bruckmaier and Hilger 2001; Fernandes et al. 2023).

### **3.4. Uso de escovas mecânicas na ordenha**

#### **3.4.1. Características e função das escovas mecânicas**

Com a tendência atual para um aumento do número de animais por exploração e a necessidade de otimizar a gestão do tempo, a ordenha, sendo uma das atividades mais exigentes em termos de tempo na produção leiteira, tem vindo a ser alvo de crescente automatização (Barkema et al. 2015; Hogan et al. 2022). Nesse sentido, a utilização das escovas mecânicas na preparação dos tetos tem vindo a ser motivo de crescente interesse, procurando aliar a eficiência e automatização do processo de ordenha à redução da variabilidade associada ao trabalho manual. Simultaneamente, a utilização destas escovas em unidades controladas pelos ordenhadores permite um maior controlo sobre a qualidade da preparação dos tetos em relação às unidades de ordenha automática. Embora estas últimas já integrem escovas para a higienização dos tetos, não têm a capacidade de adaptar a sua atividade ao grau de sujidade do úbere ou à posição dos tetos (Baumberger et al. 2016; Breen 2019).

As escovas mecânicas estão integradas numa unidade de limpeza manuseada pelos ordenhadores, sendo cada unidade composta por 3 escovas rotativas, duas superiores e uma inferior, permitindo uma higienização eficaz tanto das paredes como da extremidade do teto (Figura 1) (Baumberger et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]). Consoante as dimensões e disposição da sala de ordenha, podem ser instaladas uma ou mais unidades de limpeza; contudo, de forma geral, é utilizada uma unidade por cada 25 postos de ordenha nas salas com duas filas de postos (Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

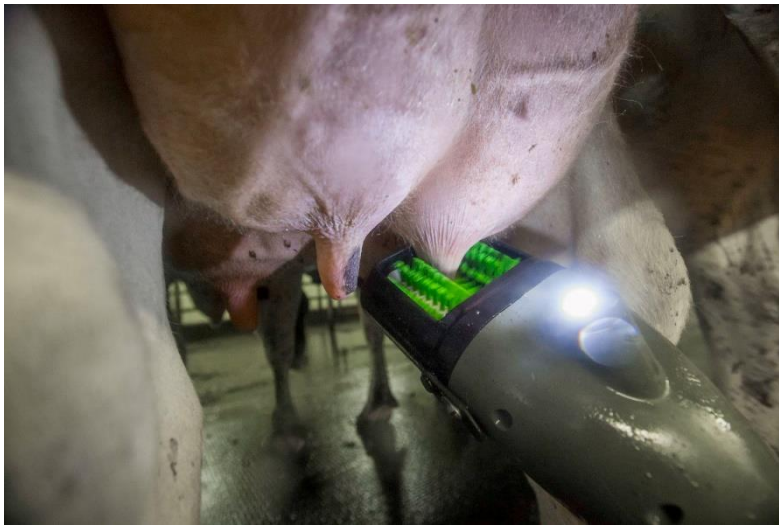


**Figura 1: Estrutura da unidade de limpeza. Adaptado de Northern Dairy Equipment LTD Brochure ([date unknown])**

A utilização das escovas mecânicas altera apenas os procedimentos de higienização e secagem dos tetos na rotina de ordenha, substituindo a aplicação manual do desinfetante pré-ordenha e a secagem manual dos tetos por um processo integrado. No momento da sua utilização, após a eliminação dos primeiros jatos de leite, o ordenhador insere um teto na entrada superior da unidade de limpeza e liga-a através de um botão (Figura 2). Numa primeira fase é feita a escovagem e limpeza do teto graças à rotação das escovas e à aplicação simultânea de uma solução desinfetante. De seguida inicia-se a segunda fase, onde as escovas estão em rotação sem líquido e o aparelho dispensa um jato de ar, com o objetivo de secar os tetos. Cada uma das fases dura poucos segundos, sendo o procedimento repetido para os quatro tetos (Baumberger et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

As escovas devem ser lavadas com água e solução desinfetante entre cada lote de animais e no final da ordenha de todos os animais, sendo recomendada a sua substituição após a preparação de aproximadamente 20000 animais, dependendo por exemplo do tipo de material das camas, sendo alguns mais abrasivos e obrigando a uma substituição mais

frequente das escovas (Baumberger et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).



**Figura 2: Utilização das escovas mecânicas na higienização dos tetos (GEA Brochure 2023)**

Para além das escovas, as unidades de limpeza incluem ainda uma luz LED, que facilita a visibilidade durante a preparação dos tetos, e um sistema de sensores de segurança, que interrompe automaticamente o funcionamento caso seja introduzido um objeto diferente dos tetos na unidade de limpeza, como a cauda do animal (GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

### **3.4.2. Vantagens e desafios das escovas mecânicas**

A grande vantagem da utilização das escovas, e também o principal motivo para a sua introdução, reside na possibilidade de realizar a higienização dos tetos de forma mais rápida e prática. A redução do tempo necessário para a preparação dos tetos pode ultrapassar os 75%, diminuindo de 47 para 11,5 segundos, o que resulta numa maior eficiência da ordenha e ainda numa maior consistência temporal, quando comparada com os métodos convencionais (Baumberger et al. 2016).

No estudo realizado por Baumberger et al. (2016) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na redução da contagem microbiana total entre os métodos convencionais e as escovas mecânicas em todas as explorações que as utilizavam com um desinfetante com uma concentração de dióxido de cloro superior a 500  $\mu\text{L/L}$ . Além disso a informação disponível no *site* da FutureCow, uma empresa fabricante das escovas mecânicas, sugere que as escovas proporcionam uma redução superior da contagem de bactérias anaeróbias formadoras de esporos no tanque de leite em comparação com os métodos convencionais.

No que respeita ao impacto físico nos operadores, apesar de as unidades de limpeza serem anunciadas como ergonómicas e leves, o esforço muscular nos membros superiores dos ordenhadores a efetuar movimentos repetitivos continua a ser significativo, podendo ser superior em determinados grupos musculares (Doupbrate et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

Para além da simplificação e otimização da rotina de ordenha, as empresas fabricantes das escovas mecânicas destacam outras potenciais vantagens associadas à sua utilização, nomeadamente a melhoria da saúde dos tetos e a redução da incidência de mastites graças a uma higienização mais eficaz, o aumento da produção leiteira associado a uma melhor estimulação do reflexo de descida do leite, a maior consistência na preparação dos tetos e a redução de determinados custos, ao eliminar a necessidade de utilizar papéis ou panos na secagem dos tetos (apesar de a despesa associada à aquisição, instalação e manutenção das unidades de limpeza e respetivos equipamentos ser substancial) (GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]). No entanto, a maioria dos benefícios anunciados baseia-se em dados fornecidos pelos próprios fabricantes. A evidência científica que suporta estas alegações, quando comparada à dos métodos convencionais, é ainda escassa. Torna-se, portanto, relevante aprofundar a investigação neste campo de forma a validar, ou não, as vantagens atribuídas a esta tecnologia.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Objetivos do estudo**

Apesar de a utilização das escovas mecânicas contribuir para a padronização e otimização da preparação dos tetos, a curta duração da sua atividade pode comprometer a eficácia da higienização ao promover um tempo de contacto insuficiente do desinfetante com a pele ou uma secagem inadequada dos tetos, fatores que são considerados potenciadores da proliferação bacteriana (Blowey and Edmondson 2010; Enger et al. 2015; Baumberger et al. 2016).

Atualmente, a evidência científica sobre a eficácia das escovas mecânicas na higienização dos tetos é ainda limitada, especialmente quando comparada com os métodos convencionais. Nesse sentido, a presente dissertação teve como objetivo principal avaliar a capacidade das escovas mecânicas para contribuir para a redução da carga microbiana na pele dos tetos. Como objetivos secundários pretendeu-se determinar essa capacidade quando as escovas funcionam de forma convencional (com aplicação de desinfetante exclusivamente durante o seu funcionamento) e quando associadas a *pre-dipping*, além de avaliar eventuais diferenças na eficácia da higienização em função dos ordenhadores.

### **4.2. Caracterização das explorações**

Este estudo foi conduzido em 3 explorações leiteiras situadas na região de Lisboa e Vale do Tejo, entre os dias 7 de abril e 3 de maio de 2025. No Contraste Leiteiro realizado nas explorações durante o mês de abril, a exploração A apresentava uma média de 397 animais em produção, com uma produção média de 47,5 kg/dia/vaca e uma CCS média de aproximadamente 188.000 células/mL; a exploração B registava uma média de 795 animais em produção, com produção média de 40,7 kg/dia/vaca e CCS média de cerca de 400.000 células/mL; a exploração C tinha uma média de 533 animais em produção, com uma produção média de 39,9 kg/dia/vaca e CCS média de cerca de 376.000 células/mL (Tabela 1).

#### **4.2.1. Salas e equipas de ordenha**

Todas as explorações realizavam 3 ordenhas diárias em salas com disposição paralela, com 16 postos de ordenha de cada lado no caso da exploração A e 20 postos de cada lado nas explorações B e C. Em todas as salas de ordenha estavam instaladas 2 unidades de limpeza com escovas mecânicas. Em todas as explorações as escovas mecânicas foram instaladas e adotadas na rotina de higienização mais de 12 meses antes da recolha das amostras. As equipas de ordenha eram constituídas por 2 ordenhadores e em todas as explorações eram seguidas rotinas de ordenha territoriais.

**Tabela 1: Caracterização das explorações**

Parâmetro	Exploração A	Exploração B	Exploração C
Número médio de vacas em produção*	397	795	533
Produção média (kg leite/vaca/dia)*	47,5	40,7	39,9
CCS média (células/mL)*	188.000	400.000	376.000
Número de ordenhas diárias	3	3	3
Tipo de sala de ordenha	Paralela 2x16	Paralela 2x20	Paralela 2x20
Número de unidades de limpeza	2	2	2
Marca das escovas mecânicas	Northern Dairy Equipment LTD	FutureCow	FutureCow
Tipo de rotina de ordenha	Territorial	Territorial	Territorial
Eliminação sistemática dos primeiros jatos	Não	Não	Sim
Aplicação de predipping	Sim (espuma)	Sim (espuma)	Não
Produto de predipping	Liq-io 5500 (Iodo 5.500 ppm)	Deosan Activate Pre/Post (Iodo 3.000 ppm)	Não utilizado
Desinfetante utilizado nas escovas	Hypred Quick Spray (ác. láctico 2%, ác. salicílico 0,01%)	Dióxido de cloro 800 ppm (ác. cítrico 50% + clorito de sódio 5,35%)	Dióxido de cloro 800 ppm (ác. cítrico 50% + clorito de sódio 5,35%)
Tempo de lavagem / secagem (segundos)	5 s / 4 s	5 s / 10 s	5 s / 4 s
Produto de postdipping	Liq-io 5500 (Iodo 5.500 ppm)	Deosan Activate Pre/Post (Iodo 3.000 ppm)	Deosan Activate Pre/Post (Iodo 3.000 ppm)
Produto para higienização das escovas	Deptil PA 5 (peróxido de hidrogénio 14,5%, ác. peracético 5%)	Dióxido de cloro 800 ppm (ác. cítrico 50% + clorito de sódio 5,35%)	Dióxido de cloro 800 ppm (ác. cítrico 50% + clorito de sódio 5,35%)
Tipo de alojamento	Cubículos	Cubículos	Cubículos
Material das camas	Areia	Areia	Areia e Palha picada

\* dados de abril de 2025

#### 4.2.2. Rotinas de preparação dos tetos

Nas explorações A e B, a rotina de preparação dos tetos era iniciada pela aplicação do *pre-dip* em espuma a todos os animais, seguida da utilização das escovas mecânicas para higienização e secagem dos tetos e remoção do desinfetante anterior. Após a colocação das tetinas e ordenha dos animais era aplicado o *post-dip*, por imersão no caso da vacaria A e de forma automatizada, diretamente na tetina, na vacaria B. A eliminação dos primeiros jatos não era efetuada por rotina na exploração A, sendo realizada semanalmente na B.

Na exploração C a rotina de ordenha era iniciada pela eliminação dos primeiros jatos de leite, não sendo realizado *pre-dipping* e sendo a higienização dos tetos feita exclusivamente com recurso às escovas mecânicas. O *post-dipping* era realizado por imersão após a ordenha.

Na exploração A as escovas mecânicas utilizadas pertencem à marca Northern Dairy Equipment LTD e operam com o desinfetante Hypred Quick Spray (Kersia), com uma formulação à base de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico e ácido salicílico. O *pre-dipping* e *post-dipping* eram realizados com Liq-io 5500 (Kersia), um produto à base de

iodo, e a higienização das escovas era efetuada entre vacas com Deptil PA 5 (Kersia), um desinfetante formulado com peróxido de hidrogénio e ácido peracético.

Nas explorações B e C utilizavam escovas mecânicas da FutureCow, que operavam com um desinfetante à base de dióxido de cloro, produzido na exploração de forma automática através da combinação de clorito de sódio (FutureCow Base - GEA) com ácido cítrico (FutureCow Activator - GEA) e água. Tanto no *pre-dip* (no caso da exploração B) como no *post-dip* era utilizado o Deosan Activate Pre/Post (Diversey), um biocida que tem como base o iodo. A higienização das escovas era realizada com o desinfetante utilizado para a higienização dos tetos.

Nas explorações A e C a programação das escovas mecânicas consistia em 5 segundos de lavagem e 4 segundos de secagem para os 4 tetos do animal, enquanto na exploração B era de 5 segundos de lavagem e 10 segundos de secagem.

Em todas as explorações os ordenhadores utilizavam luvas na sala de ordenha, embora estas não fossem desinfetadas regularmente, e a entrada e saída dos animais na sala era feita de forma calma e voluntária.

#### **4.2.3. Instalações**

Em todas as explorações os animais envolvidos no estudo estavam alojados em cubículos, sendo estes preenchidos com camas de areia nas explorações A e B e com camas de areia ou de tapete com cobertura de palha picada na exploração C.

#### **4.3. Colheita de amostras**

Em cada exploração foram colhidas amostras de 20 vacas em lactação por exploração, totalizando 60 animais, sendo a colheita das amostras distribuídas por 3 visitas a cada exploração. Os animais foram selecionados com base na sua posição nos postos da sala de ordenha, sendo escolhidos os localizados no primeiro posto de cada lado. Em cada visita, a primeira metade dos animais selecionados foi atribuída ao protocolo de higienização habitual da exploração, enquanto a segunda metade integrou o grupo submetido ao protocolo controlo, cuja higienização se baseou nos métodos convencionais de preparação dos tetos. A preparação dos tetos foi realizada integralmente pelos ordenhadores segundo o protocolo correspondente a cada grupo. Um animal na exploração A, após ter apresentado sinais clínicos no leite sugestivos de mastite foi excluído da amostragem.

A partir de cada animal foram colhidas duas amostras das paredes e extremidade dos tetos com zaragatoa: a primeira amostra (PRE) foi obtida assim que os animais se posicionavam nos postos de ordenha, antes de qualquer procedimento de higienização; a segunda amostra (POST) foi colhida imediatamente após a preparação dos tetos e antes da colocação das tetinas. No total, foram obtidas 120 amostras para análise microbiológica.

A metodologia de colheita de amostras foi adaptada de Fitzpatrick et al. (2019). Antes da colheita, as zaragatoas foram humedecidas em Trypticase Soy Broth (TSB; PanReac AppliChem - ITW Reagents) com o objetivo de otimizar a colheita dos microrganismos na pele dos tetos. As amostras PRE foram obtidas através da passagem de uma zaragatoa na pele das paredes e no orifício dos tetos, evitando qualquer contacto com os pelos do úbere, os membros posteriores ou a cauda. Este processo foi executado nos tetos anterior direito e posterior esquerdo utilizando a mesma zaragatoa, resultando numa amostra composta.

Nos animais do grupo Teste, a higienização dos tetos seguiu a rotina habitual da exploração. No grupo Controlo, a higienização foi efetuada com um desinfetante à base de iodo (o mesmo utilizado no *pre-dipping*, quando aplicável, e *post-dipping* de cada exploração), seguida de secagem com toalhete de papel individual (explorações A e C) ou pano individual (exploração B). As amostras POST, obtidas após a higienização dos tetos, foram colhidas segundo a metodologia anteriormente descrita para as amostras PRE.

Após a colheita, as zaragatoas foram acondicionadas em tubos de ensaio estéreis contendo 5 mL de TSB, no caso das amostras PRE, ou de TSB e neutralizador, no caso das amostras POST. A composição do neutralizador incluía 30 g/L de Polissorbato 80 (Tween 80, Fisher BioReagents), 10 g/L de Tiosulfato de sódio (Thermo Scientific) e 3 g/L de Lecitina (Thermo Scientific), e destinava-se a neutralizar o efeito bactericida dos biocidas utilizados na higienização dos tetos, que pudessem estar presentes na pele. As amostras foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até ao seu processamento no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UL, num prazo máximo de 8 horas após a colheita.

#### **4.4. Validação do neutralizador e do método**

A formulação do neutralizador, tal como os protocolos de validação da sua ausência de toxicidade e da sua eficácia na inativação dos desinfetantes utilizados, foram realizados de acordo com o *European Standard 1656:2009*, específico para substâncias desinfetantes utilizadas em Medicina Veterinária.

A validação da ausência de toxicidade teve como objetivo confirmar a ausência de efeito inibitório do neutralizador sobre o crescimento bacteriano, garantindo assim a fiabilidade das contagens microbiológicas das amostras POST. Para esse efeito, foram utilizadas estirpes de referência (*Escherichia coli* DSM 682; *Staphylococcus aureus* CECT 239; *Streptococcus uberis* DSM 20569) preparadas em diluente Triptona-sal - 1 g/L de Triptona (Diagnostic Liofilchem) e 8,5 g/L de Cloreto de sódio (NaCl; Merck), dissolvidos em água estéril. Foi então inoculado 1 mL das suspensões bacterianas em dois tipos de tubos: um contendo 8 mL de TSB com neutralizador e 1 mL de água estéril (grupo Teste), e outro com 9 mL de água estéril (grupo Controlo). De ambos os tubos foram retirados 100 µL, que foram inoculados por espalhamento, em duplicado, em meio de cultura Trypticase Soy Agar (TSA; PanReac

AppliChem - ITW Reagents), seguindo-se incubação a 37 °C durante 48 horas e posterior contagem das unidades formadoras de colónias (UFC). A comparação entre os resultados obtidos em ambos os grupos (Anexo I) revelou crescimento bacteriano semelhante, permitindo considerar que o neutralizador não apresentou efeito inibitório visível sobre o crescimento bacteriano.

A validação da eficácia de neutralização teve como objetivo verificar a eficácia do neutralizador na inativação dos compostos biocidas utilizados nas explorações, nomeadamente as soluções à base de iodo e os desinfetantes utilizados pelas escovas mecânicas. Foram testadas as substâncias em uso na exploração B e C, mais concretamente o dióxido de cloro produzido pela combinação de FutureCow Activator (GEA) e FutureCow Base (GEA) e o Deosan Activate Pre/Post (Diversey). Foi inoculado 1 mL das suspensões bacterianas anteriormente referidas em três tipos de tubos: os grupos Iodo ou Escovas, consoante a substância desinfetante, contendo 8 mL de TSB com neutralizador, 0,8 mL de solução biocida, 0,1 mL de água estéril e 0,1 mL de diluente Triptona-sal; e o grupo Controlo, contendo apenas 9 mL de água estéril. As soluções foram mantidas à temperatura ambiente durante 60 segundos, simulando o tempo de exposição aos desinfetantes nas condições práticas da sala de ordenha. Após esse período, foram retirados 100 µL de cada tubo, que foram igualmente inoculados por espalhamento, em duplicado, em placas de TSA, seguidas de incubação a 37 °C durante 48 horas para posterior contagem das UFC. A comparação dos resultados obtidos entre os dois grupos (Anexo I) revelou crescimento bacteriano viável e semelhante, comprovando a eficácia do neutralizador na inativação da atividade antimicrobiana residual dos produtos testados.

Importa ainda referir que o TSB com neutralizador necessário para todo o ensaio teve de ser preparado em dois momentos distintos. Como tal, as validações da ausência de toxicidade e da eficácia de neutralização foram igualmente realizadas em duplicado, utilizando lotes diferentes da mesma formulação. Esta repetição permitiu confirmar a consistência dos resultados obtidos e reforçar a reprodutibilidade do método utilizado.

#### **4.5. Processamento de amostras**

No laboratório, todas as amostras foram inicialmente homogeneizadas em vórtex durante aproximadamente 15 segundos nos respetivos tubos de ensaio. A partir das suspensões obtidas foram realizadas diluições seriadas de base 10 em NaCl a 0.9%, com o objetivo de obter concentrações bacterianas adequadas para quantificação.

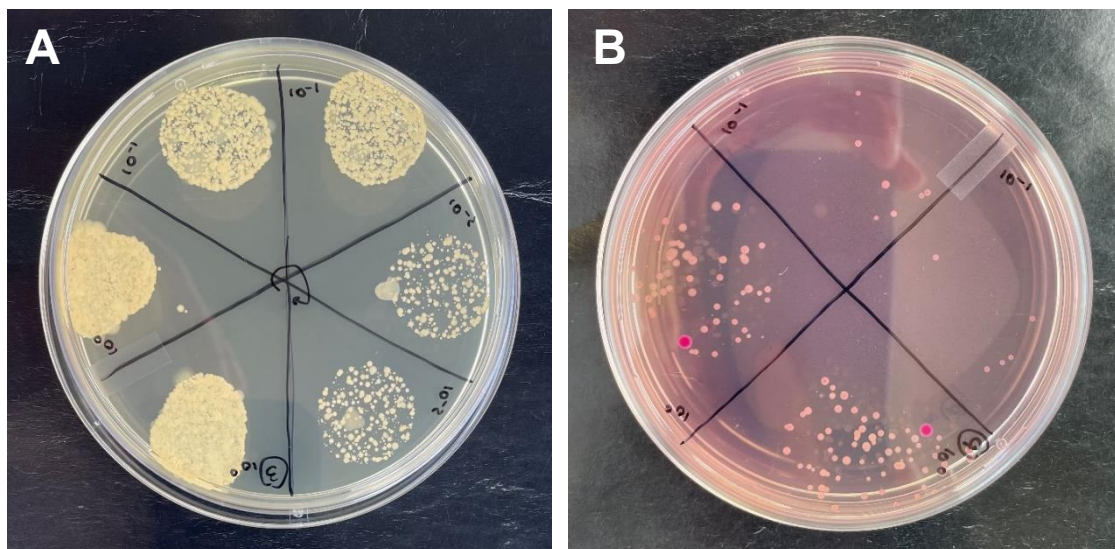
A inoculação em placa foi realizado em 2 meios de cultura diferentes: TSA, para a contagem total de bactérias, e agar de MacConkey (MCK; PanReac AppliChem - ITW Reagents), para contagem de enterobactérias. Apesar de este último permitir a multiplicação de outras bactérias Gram-negativas não pertencentes à família Enterobacteriaceae,

assume-se, com base nas características seletivas e diferenciais do meio, que a maioria das colónias presentes se trata de enterobactérias. Assim, para efeitos de simplificação terminológica ao longo desta dissertação, será adotada a designação "enterobactérias" para as contagens obtidas em meio de cultura MacConkey.

A inoculação em meio de cultura foi realizada segundo o método da microgota, que consistiu em dividir a superfície de cada placa de Petri em segmentos correspondentes às diferentes diluições e aplicar 20  $\mu$ L de cada diluição nesses segmentos, em duplicado (Herigstad et al. 2001).

A gama de diluições utilizada foi determinada com base nos resultados da primeira visita a cada exploração. Nessa fase foram colhidas amostras PRE e POST de 4 animais (2 do grupo Teste e 2 do grupo Controlo) de todas as explorações e foram realizadas diluições até  $10^{-11}$ . Após análise dos resultados obtidos, procedeu-se à adaptação da gama de diluições para o restante ensaio, estabelecendo-se de  $10^0$  até  $10^{-5}$  para o meio de cultura MacConkey e até  $10^{-8}$  para o meio de cultura TSA. Uma vez que a única diferença metodológica dessas amostras preliminares foi a amplitude da janela de diluições testada, os seus resultados foram incluídos na análise estatística do estudo.

As placas de TSA e MacConkey foram incubadas na estufa a 37 °C durante 48 horas. A quantificação das UFC em cada placa foi realizada às 24 e 48 horas (Figuras 3A e 3B), sendo considerada para a análise estatística a diluição que apresentasse entre 6 e 60 colónias por segmento em qualquer um dos dois momentos, conforme recomendado por Herigstad et al. (2001).



**Figuras 3A e 3B: Placas com meios de cultura TSA (3A) e MacConkey (3B) após 48 horas de incubação (fotos originais)**

Quando duas diluições consecutivas apresentavam contagens dentro deste intervalo, foi utilizada a média das contagens para o cálculo. Os segmentos onde a quantificação se revelou incontável por não ser possível individualizar as colónias foram considerados como tendo mais de 60 colónias. Quando apenas o inóculo “não diluído” apresentou crescimento bacteriano e com menos de 6 colónias, foi utilizado o número de colónias verificado para a análise estatística. O cálculo das unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) foi realizado com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = (\text{número de colónias} \times \text{inverso do fator de diluição}) / \text{volume do inóculo.}$$

#### **4.6. Análise estatística**

Os dados recolhidos ao longo do ensaio foram organizados no programa Excel do Microsoft 365 e a análise estatística foi realizada no programa IBM SPSS® Statistics for Windows, versão 29.0.0.0.

As contagens bacterianas obtidas (UFC/mL) foram convertidas em logaritmos de base 10 para a análise dos dados, tendo sido utilizada a fórmula  $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ . A redução microbiana na pele dos tetos após a sua higienização foi determinada pela diferença entre os valores logarítmicos obtidos nas amostras pré e pós-higienização de cada animal (valores positivos indicam um decréscimo da carga bacteriana do momento pré para o momento pós-higienização), sendo posteriormente analisada por grupo bacteriano. A redução da carga bacteriana foi considerada variável dependente e exploração, protocolo de higienização e ordenhador variáveis independentes. O animal foi considerado a unidade experimental.

Ao nível da estatística descritiva foram calculados média, desvio-padrão, mediana, mínimo, máximo e intervalo interquartis (Anexo II) para as variáveis associadas às quantificações bacterianas logarítmicas dos momentos pré e pós-higienização e à redução logarítmica, para ambos os meios de cultura (TSA e MacConkey).

Tendo em consideração o reduzido número de animais avaliados por exploração ( $n = 20$ ), a análise estatística foi realizada com recurso a testes não paramétricos. A comparação das contagens bacterianas pré-higienização e das reduções logarítmicas entre os grupos Teste e Controlo foi feita com recurso ao teste de Mann-Whitney. A comparação das contagens pré-higienização entre as diferentes explorações foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis; sempre que se verificaram diferenças estatisticamente significativas, foi aplicado um teste de Dunn, com ajuste de Bonferroni, para identificar entre que pares de explorações se observavam essas diferenças. A existência de uma redução estatisticamente significativa da carga bacteriana após a higienização foi avaliada com o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas. A avaliação da homogeneidade dos resultados da redução da carga bacteriana foi feita com o teste de Levene, procurando determinar se um dos protocolos conduziu a uma dispersão dos resultados significativamente diferente do outro dentro de cada

exploração. A comparação da eficácia da higienização realizada pelos diferentes ordenhadores de cada exploração foi realizada com recurso aos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis (para dois ou mais de dois grupos, respetivamente).

Todos os testes estatísticos foram conduzidos considerando um intervalo de confiança de 95%, sendo considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

Com o intuito de facilitar a interpretação dos resultados optou-se por apresentar neste capítulo apenas os resultados relativos às 48 horas de incubação. Os resultados das contagens às 24 horas serão incluídos apenas quando apresentarem diferenças relevantes face aos observados às 48 horas. Todos os dados correspondentes às contagens bacterianas às 24 e 48 horas encontram-se disponíveis no Anexo III.

### 5.1. Quantificação bacteriana em função dos protocolos de higienização

#### 5.1.1. Contagem de microrganismos totais após 48 horas de incubação

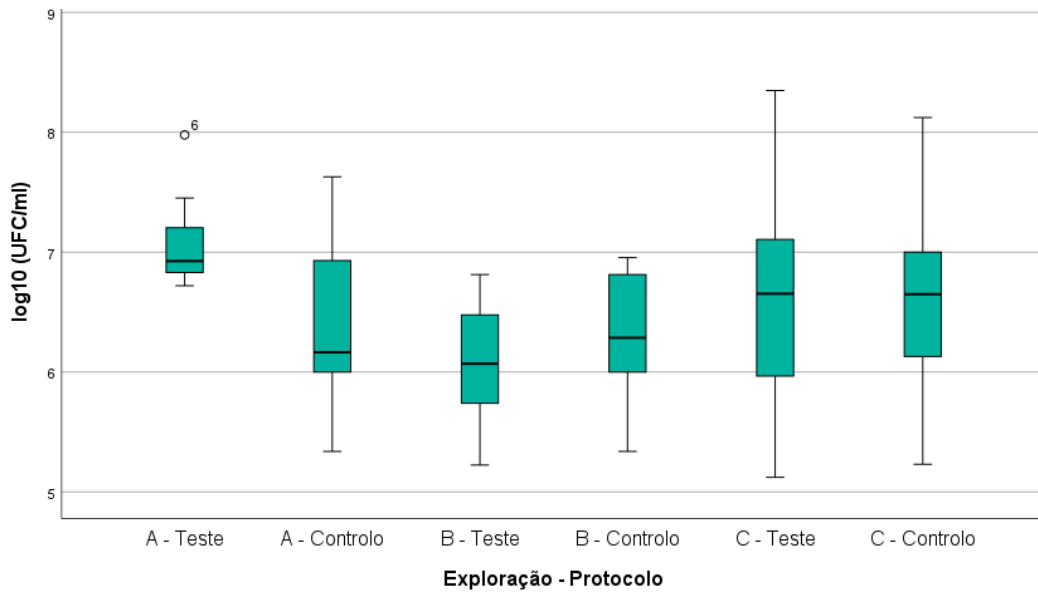
A Tabela 2 apresenta as medianas das quantificações e reduções microbianas logarítmicas totais. O Gráfico 1 ilustra a quantificação bacteriana logarítmica correspondente à contagem total de bactérias pré-higienização após 48 horas de incubação. O grupo teste da exploração A apresenta um *outlier* de valor superior aos restantes do mesmo grupo. Apesar de a exploração A apresentar uma diferença entre as medianas dos grupos Teste e Controlo superior às das outras explorações, o teste de Mann-Whitney não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos em qualquer das explorações ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2: Medianas das quantificações e reduções microbianas logarítmicas totais**

Mediana	Exploração - Grupo					
	A - Teste	A - Controlo	B - Teste	B - Controlo	C - Teste	C - Controlo
<b>PRE (log10)</b>	6,925	6,165	6,069	6,285	6,653	6,650
<b>POST (log10)</b>	3,725	5,054	4,687	5,020	5,464	5,131
<b>RED (log10)</b>	3,076	1,270	1,460	1,417	1,143	1,062

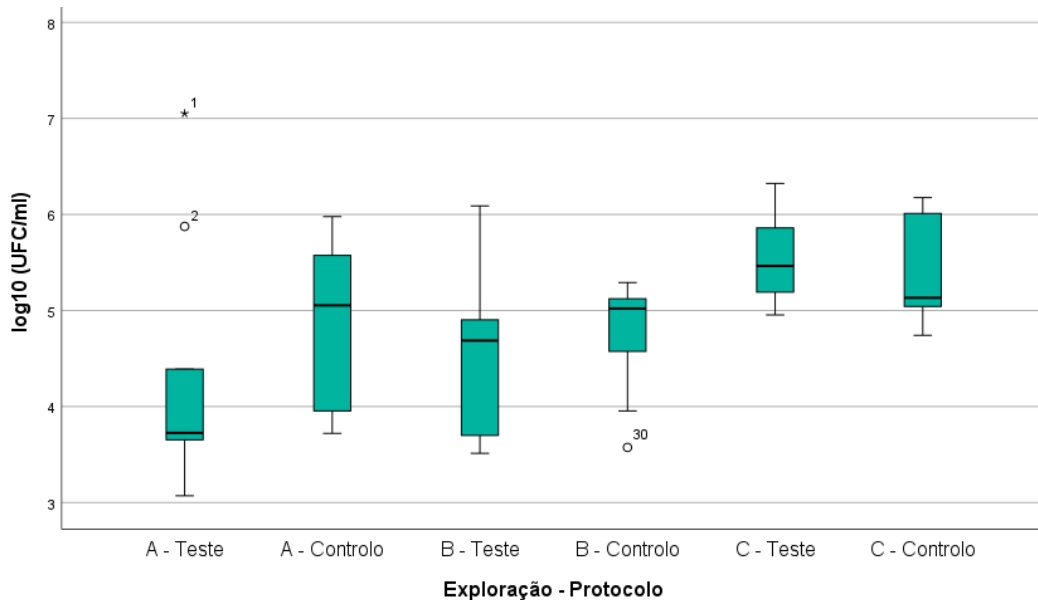
O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre as contagens bacterianas pré-higienização de 2 das explorações, uma vez que  $p = 0,024$ . A análise com o teste de Dunn, com correção de Bonferroni, revelou uma diferença estatisticamente significativa na contagem bacteriana total pré-higienização entre as explorações A e B ( $p = 0,028$ ), sendo a exploração B aquela que apresentou valores mais baixos. Não se verificaram diferenças significativas entre os restantes pares de explorações ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 1: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica total - pré-higienização**



O Gráfico 2 representa a quantificação bacteriana após a higienização dos tetos. O grupo Controlo apresenta uma carga bacteriana com uma mediana superior ao grupo Teste nas explorações A e B; pelo contrário, na exploração C, esta relação inverte-se. Na exploração A, grupo Teste, e na exploração B, grupo Controlo, verificam-se, respetivamente, dois *outliers* de valor superior e um *outlier* de valor inferior aos restantes.

**Gráfico 2: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica total - pós-higienização**



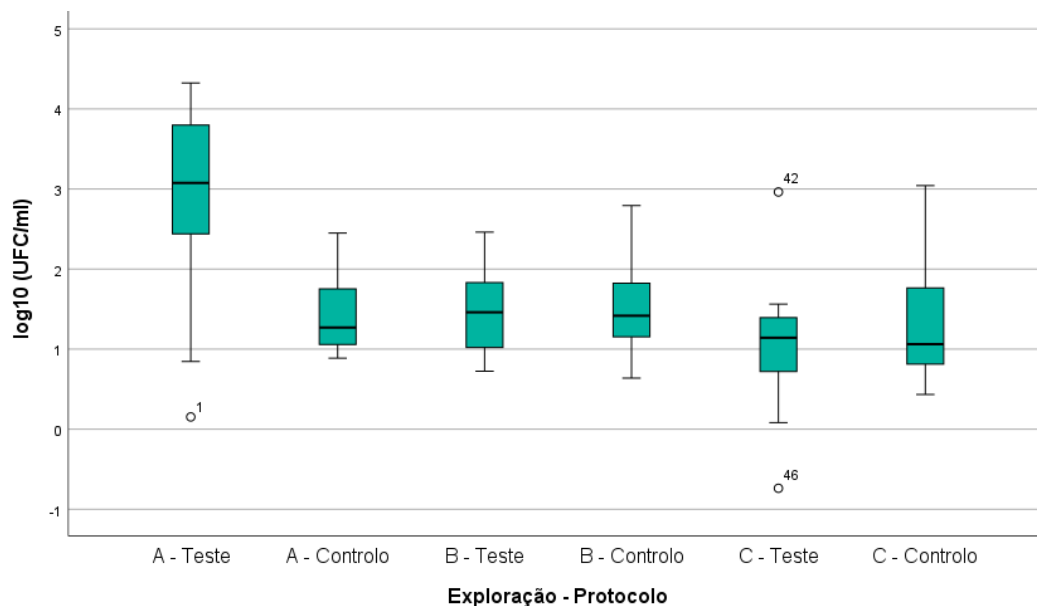
Tal como ilustrado no Gráfico 3, em todas as explorações foi o grupo Teste a apresentar uma mediana mais elevada na redução logarítmica das contagens bacterianas. O grupo Teste da exploração A apresenta um *outlier* de valor inferior, enquanto o grupo Teste da exploração C apresenta dois *outliers* - um de valor inferior e um de valor superior, em relação aos

restantes do mesmo grupo. Além disso, é de destacar que num dos animais higienizados com o protocolo Teste na exploração C se registou uma redução de valor negativo, correspondente a um aumento da carga bacteriana após a higienização.

O teste de Wilcoxon revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as contagens bacterianas antes e após a higienização em todos os grupos. O teste de Mann-Whitney revelou significância apenas na exploração A ( $p = 0,028$ ), indicando uma redução da carga microbiana total marcadamente superior com a aplicação do protocolo Teste. Nas explorações B e C os valores de  $p$  foram de 0,880 e 0,597, respetivamente.

Os resultados do teste de Levene indicaram ausência de diferenças estatisticamente significativas na homogeneidade dos resultados dos grupos Teste e Controlo em todas as explorações ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 3: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana total**



### 5.1.2. Contagem de Enterobacteriaceae após 48 horas de incubação

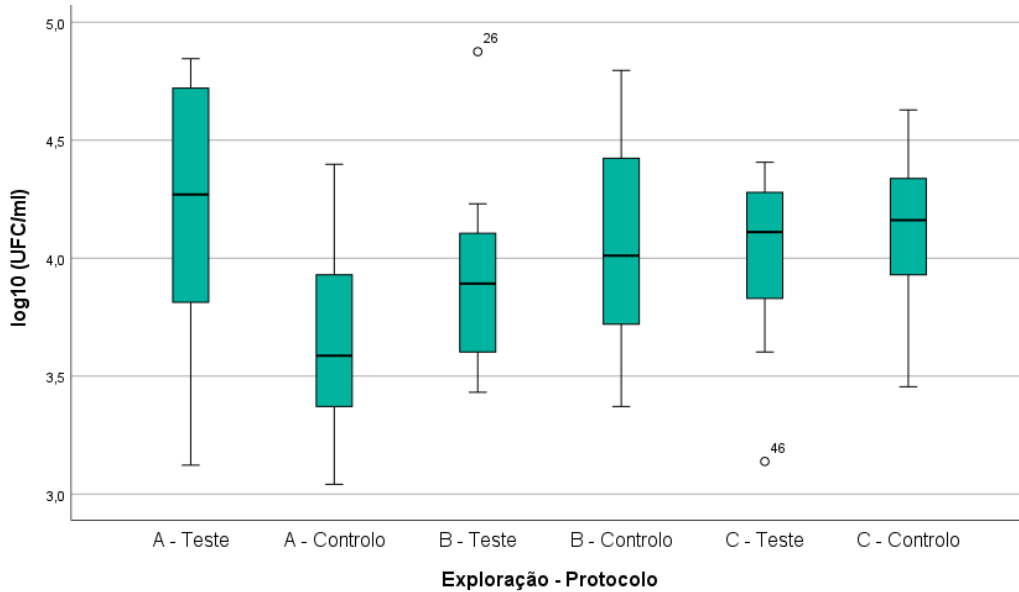
A Tabela 3 apresenta as medianas das quantificações e reduções microbianas logarítmicas de enterobactérias. O Gráfico 4 representa a distribuição das contagens de enterobactérias pré-higienização, onde a maior diferença entre as medianas dos 2 grupos da mesma exploração se verifica na exploração A, embora o teste de Mann-Whitney não tenha identificado significância estatística ( $p = 0,052$ ). Nas explorações B e C, os valores de  $p$  foram de 0,684. O grupo Teste da exploração B apresenta um *outlier* de valor superior aos restantes do seu grupo, enquanto o grupo Teste da exploração C apresenta um de valor inferior.

O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças estatisticamente significativas entre as explorações no que toca às contagens pré-higienização, uma vez que  $p = 0,534$ .

**Tabela 3: Medianas das quantificações e reduções logarítmicas de enterobactérias**

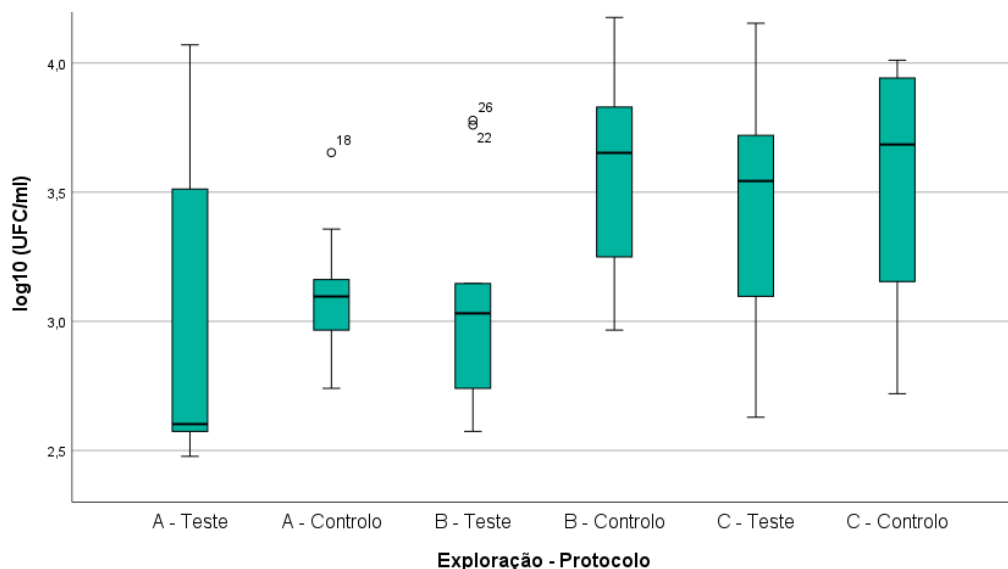
Mediana	Exploração - Grupo					
	A - Teste	A - Controlo	B - Teste	B - Controlo	C - Teste	C - Controlo
<b>PRE (log10)</b>	4,269	3,586	3,892	4,011	4,111	4,161
<b>POST (log10)</b>	2,602	3,096	3,031	3,652	3,543	3,684
<b>RED (log10)</b>	1,066	0,488	0,843	0,370	0,639	0,495

**Gráfico 4: Gráfico box-plot da quantificação logarítmica de enterobactérias - pré-higienização**



exploração, foi inferior nos grupos Teste de todas as explorações. O grupo Controlo da exploração A e o grupo Teste da exploração B apresentam, respetivamente, um e dois *outliers* de valor superior aos restantes (Gráfico 5).

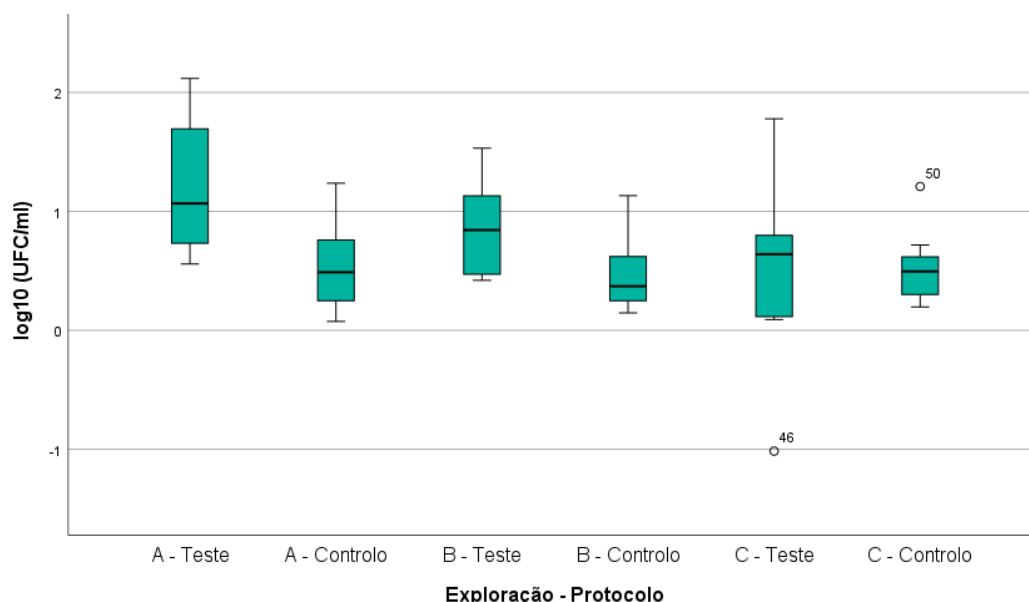
**Gráfico 5: Gráfico box-plot da quantificação logarítmica de enterobactérias - pós-higienização**



Tal como representado no Gráfico 6, a redução da carga bacteriana após a higienização dos tetos teve valores medianos superiores nos animais submetidos ao protocolo Teste em todas as explorações. Na exploração C, os grupos Teste e Controlo apresentaram, respetivamente, um *outlier* de valor inferior e um de valor superior aos restantes do mesmo grupo. Tal como na contagem total de bactérias, verificou-se uma redução da carga bacteriana de valor negativo num dos animais da exploração C submetido ao protocolo Teste.

O teste de Wilcoxon confirmou uma redução estatisticamente significativa da carga bacteriana em todos os grupos ( $p < 0,05$ ). O teste de Mann-Whitney identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Teste e Controlo nas explorações A ( $p = 0,005$ ) e B ( $p = 0,028$ ). Na exploração C, o valor de  $p$  foi de 0,705, não atingindo significância estatística. Os resultados do teste de Levene não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas na homogeneidade dos grupos em qualquer das explorações ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 6: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação de enterobactérias**



### 5.1.3 Quantificação bacteriana após 24 horas de incubação

Tal como verificado após 48 horas de incubação, o teste de Kruskal-Wallis também revelou diferenças estatisticamente significativas entre pelo menos 2 das explorações no que toca às contagens bacterianas totais pré-higienização após 24 horas de incubação, uma vez que  $p = 0,041$ . No entanto, as comparações par-a-par realizadas com o teste de Dunn, com o ajuste de Bonferroni, não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre pares de explorações, uma vez que o valor de  $p$  foi superior a 0,05 em todas. A comparação entre as explorações A e B apresentou um valor próximo ao limiar de significância ( $p = 0,067$ ), sugerindo uma possível tendência, mas sem atingir o limiar de significância considerado.

Além desta, a outra diferença relevante encontrada entre os resultados dos dois períodos de incubação foi o facto de o teste de Levene ter identificado uma heterogeneidade significativa dos resultados da contagem total de bactérias na redução logarítmica bacteriana da exploração A ( $p = 0,024$ ), com maior dispersão no grupo Teste, não se verificando diferenças significativas nas explorações B ( $p = 0,200$ ) e C ( $p = 0,471$ ).

## 5.2. Quantificação bacteriana em função dos ordenhadores

Com o objetivo de avaliar se a eficácia do protocolo de higienização convencional de cada exploração variava significativamente em função do operador, procedeu-se à análise das reduções logarítmicas das contagens bacterianas em função dos ordenhadores. Dado o tamanho reduzido da amostra, foram aplicados testes estatísticos não paramétricos: o teste de Mann-Whitney nas explorações A e B, uma vez que os dados correspondem a apenas dois ordenhadores, e o teste de Kruskal-Wallis na exploração C, onde as amostras se distribuem por quatro ordenhadores (Tabela 4). A Tabela 5 representa as medianas das reduções microbianas logarítmicas para cada ordenhador

**Tabela 4: Distribuição das amostras do grupo Teste pelos diferentes ordenhadores de cada exploração**

Exploração	Ordenhador			
	a	b	c	d
A	6	4		
B	5	5		
C	2	2	3	3

A Tabela 5 representa as medianas das reduções microbianas logarítmicas dos dois indicadores microbiológicos para cada ordenhador. Na avaliação após 48 horas de incubação, os valores de  $p$  obtidos para a contagem total de bactérias foram de 0,831 na exploração A, 0,917 na exploração B e 0,239 na exploração C. Do mesmo modo, para a contagem de enterobactérias, os valores de  $p$  registados foram de 0,522 na exploração A, 0,076 na exploração B e 0,186 na exploração C. Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os ordenhadores em qualquer das explorações, quer relativamente à redução da contagem total de bactérias quer à redução da contagem de enterobactérias.

**Tabela 5: Medianas das reduções microbianas logarítmicas de cada ordenhador**

<u>Exploração - Ordenhador</u>	<u>Mediana RED - Bactérias Totais</u>	<u>Mediana RED - Enterobactérias</u>
A - a	3,076	0,786
A - b	3,396	1,346
B - a	1,347	0,471
B - b	1,574	1,097
C - a	2,178	0,885
C - b	1,143	0,947
C - c	0,776	0,681
C - d	0,083	0,090

## 6. Discussão

A higienização dos tetos antes da ordenha visa remover a matéria orgânica e reduzir a carga bacteriana presentes na pele, assegurando que os tetos sejam ordenhados secos e limpos, promovendo a qualidade do leite e reduzindo o risco de mastites, sobretudo as causadas por agentes ambientais (Pankey 1989; Blowey and Edmondson 2010; Watters et al. 2012; NMC 2013). As escovas mecânicas surgiram como uma alternativa ao *pre-dipping* e limpeza dos tetos convencional, e a sua utilização na preparação dos tetos pretende simultaneamente padronizar o processo de higienização dos tetos e aumentar a eficiência da ordenha (Baumberger et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

Estudos prévios demonstraram que a combinação de um desinfetante e a ação física de, por exemplo, um toalhete de papel ou um pano no momento da secagem dos tetos, é mais eficaz na redução da carga bacteriana do que a utilização isolada de um biocida (Galton et al. 1984). As escovas baseiam-se neste mesmo princípio, conjugando a ação mecânica da sua fricção rotativa com a aplicação do desinfetante e posterior secagem. Esta ação mecânica é também relevante para a remoção do biocida, reduzindo o risco de contaminação do leite (Gleeson et al. 2009).

Neste estudo, a eficácia da higienização foi avaliada com base na redução da carga bacteriana da pele dos tetos, utilizando como indicadores microbiológicos a contagem total de bactérias em meio de cultura TSA e a contagem de enterobactérias em meio de cultura MacConkey. Apesar de bactérias como *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. serem mais frequentes na pele dos tetos (Baumberger et al. 2016; Fitzpatrick et al. 2019), a escolha das enterobactérias justifica-se pelo seu valor como indicadores de segurança dos alimentos e da higiene ambiental e das práticas de ordenha, além da facilidade, rapidez e baixo custo associados à sua quantificação em meio MacConkey (Tsai et al. 2022; Vargova et al. 2023).

As contagens bacterianas foram convertidas em logaritmos de base 10, um procedimento comum na análise estatística de dados microbiológicos que visa atenuar a dispersão assimétrica e altamente variável, com amplitudes que podem variar entre várias ordens de magnitude, facilitando a análise estatística e a interpretação dos resultados. Ainda assim, dado o reduzido tamanho amostral, optou-se por aplicar testes estatísticos não paramétricos.

Apesar de as explorações A e B incluírem um *pre-dipping* à base de iodo antes da aplicação das escovas e a exploração C recorrer exclusivamente às escovas mecânicas com a aplicação de biocida em simultâneo com a rotação das escovas (comum às outras duas explorações) para a higienização dos tetos, optou-se por não agrupar os dados com base no tipo de protocolo de forma a evitar enviesamentos associados às diferenças entre as explorações, como o fabricante das escovas, a sua programação ou a substância desinfetante

utilizada. Os resultados obtidos às 24 e 48 horas de incubação foram, na sua globalidade, semelhantes. Por isso, na exposição dos resultados optou-se por expor os dados das 48 horas, complementando com os das 24 horas apenas quando existissem divergências.

De acordo com o conhecimento do autor da dissertação, o único estudo identificado que avalie diretamente a eficácia das escovas mecânicas através de contagens bacterianas é o de Baumberger et al. (2016), sendo particularmente relevante para comparação dado utilizar escovas e desinfetantes idênticos aos das explorações B e C do presente estudo. As contagens bacterianas totais pré-higienização registadas no estudo de Baumberger et al. (2016) (média de 5,81 log<sub>10</sub>) foram inferiores às verificadas no presente estudo (medianas entre 6,07 e 6,93 log<sub>10</sub>). Uma vez que o estudo realizado por Baumberger et al. (2016) aplicou a fórmula de conversão log<sub>10</sub>(UFC/ml+1), é de esperar que possa existir uma ligeira sobrevalorização dos resultados face à fórmula log<sub>10</sub>(UFC/ml) aqui adotada.

Apesar de não terem sido detetadas diferenças significativas nas contagens bacterianas pré-higienização entre os grupos Teste e Controlo em qualquer exploração, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as explorações A e B. Curiosamente, estas diferenças ocorreram entre explorações que utilizam exclusivamente areia como material de cama, enquanto a exploração C, que utiliza palha picada (um material orgânico) nas camas de alguns parques, não apresentou valores significativamente diferentes das outras explorações. Embora materiais inorgânicos como a areia estejam associados a uma menor carga microbiana e a um menor risco de ocorrência de mastites causadas por agentes ambientais, fatores como a granulometria, limpeza, armazenamento e frequência de renovação do material das camas ou o conforto e condições ambientais do parque influenciam a carga bacteriana e a exposição dos tetos aos microrganismos e podem ajudar a explicar tanto as diferenças nas contagens das explorações A e B como nos resultados das contagens bacterianas pré-higienização entre este estudo e o desenvolvido por Baumberger et al. (2016) (Hogan et al. 1989; Patel et al. 2019; Robles et al. 2020; Godden and Royster 2025).

Em todos os grupos avaliados, independentemente da exploração e do protocolo, verificou-se uma redução significativa da carga bacteriana ( $p < 0,05$ ), resultados em linha com a literatura (Mišeikienė et al. 2015; Baumberger et al. 2016; Fitzpatrick et al. 2019; Fitzpatrick et al. 2021b; Vargova et al. 2023). No entanto, ao comparar os protocolos Teste e Controlo, só se verificou uma eficácia significativamente maior ( $p < 0,05$ ) da utilização das escovas mecânicas na exploração A (nos dois indicadores microbiológicos investigados) e na exploração B (na avaliação de enterobactérias). Na exploração C não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois protocolos em qualquer dos indicadores microbiológicos.

Estas diferenças poderão estar relacionadas com a combinação de dois momentos de higienização nas explorações A e B (*pre-dipping* e escovas) com substâncias desinfetantes

distintas, enquanto a exploração C apenas recorre às escovas mecânicas para a preparação dos tetos. O iodo, utilizado no *pre-dipping* (e *post-dipping*), é um biocida de largo espectro, capaz de penetrar a parede celular dos microrganismos e interferir com componentes fundamentais como proteínas, nucleótidos e ácidos gordos, culminando na morte celular (McDonnell and Russell 1999). O dióxido de cloro, utilizado nas explorações B e C, é um agente oxidante com ação microbiocida ampla resultante da combinação entre clorito de sódio e um ácido. Atua sobre proteínas celulares, inativando-as por oxidação e comprometendo a viabilidade dos microrganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos (McDonnell and Russell 1999; Boddie et al. 2000; Nickerson 2001 citado por Baumberger et al. 2016). O ácido láctico, utilizado na exploração A, apresenta atividade antimicrobiana especialmente eficaz contra bactérias Gram-negativas, promovendo a acidificação do meio e a destabilização da membrana citoplasmática, o que leva à perda de integridade celular e consequente lise (Alakomi et al. 2000; Ricke 2003; Boomsma et al. 2015). Niero et al. (2024) observaram que dois *pre-dippings* (com a mesma ou com diferentes substâncias biocidas) promovem uma redução bacteriana superior à de um único, e Fitzpatrick et al. (2019) e Fitzpatrick et al. (2021a) demonstraram que a eficácia dos desinfetantes é variável consoante o tipo de microrganismo. Nesse sentido, a combinação de desinfetantes distintos pode ter proporcionado um espectro antimicrobiano mais amplo e uma eficácia bactericida mais elevada.

Baumberger et al. (2016) observaram uma redução logarítmica média na contagem total de bactérias de 1,97 log<sub>10</sub> no grupo dos animais higienizados com escovas e de 2,26 log<sub>10</sub> nos animais sujeitos à higienização com *pre-dipping*. Dos grupos avaliados no presente estudo, apenas o protocolo Teste da exploração A apresentou uma mediana superior aos resultados observados por Baumberger et al. (2016). O facto de o seu protocolo de colheita de amostras POST não incluir uma substância com efeito neutralizador, que interrompa a ação bactericida dos resíduos de desinfetante eventualmente presentes na pele dos tetos após a higienização, poderá ter prolongado a ação bactericida, influenciando as reduções bacterianas observadas.

A ausência de diferenças significativas na eficácia entre a utilização exclusiva de escovas mecânicas e de *pre-dipping* à base de iodo também foi observada na maioria das explorações avaliadas por Baumberger et al. (2016). No entanto nesse estudo verificou-se que, em 30% (3/10), 20% (2/10) e 10% (1/10) das explorações, a redução da contagem total de bactérias, de *Streptococcus* spp. e de *Staphylococcus* spp., respetivamente, foi significativamente superior no grupo submetido ao *pre-dipping* em comparação com o grupo das escovas mecânicas. Relativamente à contagem de bactérias Gram-negativas, o tratamento com escovas demonstrou maior eficácia do que o grupo Controlo em 30% (3/10) das explorações, ao passo que a situação inversa se verificou em apenas 10% (1/10). Importa

salientar que, em todas as explorações onde foi utilizada uma concentração de dióxido de cloro superior a 500 µL/L, não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois métodos de higienização no que respeita à contagem total de bactérias ou à contagem de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Apesar de no presente estudo não terem sido realizadas contagens específicas para os géneros *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., os resultados relativos à contagem total de bactérias obtidos na exploração C - que, à semelhança das explorações avaliadas por Baumberger et al. (2016), recorria exclusivamente à utilização de escovas na higienização pré-ordenha, com aplicação de dióxido de cloro numa concentração de 800 µL/L - revelaram-se coerentes com os valores reportados por aqueles autores.

O aumento da carga bacteriana após a higienização dos tetos verificada num dos membros do grupo Teste da exploração C pode estar relacionado com um elevado grau de conspurcação das escovas mecânicas no momento da higienização dos tetos deste animal ou com a contaminação acidental destes através, por exemplo, do contacto dos membros posteriores ou da cauda com os tetos após a sua higienização.

O teste de Levene revelou diferenças significativas apenas na homogeneidade da contagem total de bactérias dos grupos da exploração A, sendo o grupo Teste o menos homogéneo. Ainda que as diferenças verificadas entre os dois protocolos nesta exploração não sejam consistentes nos dois períodos de incubação, a verdade é que, tal como observado por Baumberger et al. (2016), o grupo Teste não apresentou uma homogeneidade significativamente superior ao grupo Controlo em qualquer das explorações, não se verificando a esperada padronização dos resultados com a utilização das escovas mecânicas na limpeza dos tetos. Ainda assim, a ausência de diferenças estatisticamente significativas na eficácia da higienização dos diferentes ordenhadores de cada exploração sugere que o desempenho individual não teve um impacto relevante - um aspeto importante quando se pretende uniformizar as práticas de ordenha, uma das vantagens apontadas às escovas mecânicas (Baumberger et al. 2016; GEA 2023; Northern Dairy Equipment LTD [date unknown]).

Na interpretação dos resultados obtidos com o presente estudo é necessário considerar algumas limitações, nomeadamente o reduzido tamanho amostral, a elevada variabilidade entre explorações (tal como já verificado nas diferenças da carga bacteriana dos animais antes da higienização, mas também no fabricante das escovas, nas substâncias desinfetantes utilizadas e respetiva concentração e na programação das escovas) e a variabilidade inerente à recolha de amostras em contexto de campo. Além disso, no caso da contagem de enterobactérias, a utilização do meio de cultura MacConkey pode ter permitido a multiplicação de bactérias Gram-negativas não pertencentes à família Enterobacteriaceae (como *Pseudomonas* spp.), o que poderá ter conduzido a uma sobrevalorização deste grupo.

Ainda que normalmente seja possível distinguir colónias fermentadoras e não fermentadoras de lactose, o que poderia promover a distinção destes dois grupos bacterianos, essa diferenciação nem sempre é clara, pelo que se optou por não a realizar.

Apesar de os resultados sugerirem que, para serem detetadas diferenças na eficácia de higienização, as escovas mecânicas devem ser associadas à aplicação de *pre-dip*, o facto de as explorações que utilizam as escovas mecânicas na higienização dos tetos apresentarem tantas diferenças a nível ambiental e operacional faz com que não seja possível atribuir os resultados encontrados exclusivamente à utilização, ou não, de um *pre-dipping* adicional. Para estudos futuros, e de forma a ser possível tirar conclusões mais fidedignas, é importante que esta avaliação seja realizada em mais explorações e com um maior número de amostras e de grupos bacterianos. Para além disso, também estudos que incluam outras variáveis, como a qualidade do leite, a integridade da pele dos tetos ou a relação custo-benefício dos vários protocolos de higienização dos tetos são essenciais para validar a eficácia das escovas mecânicas e fundamentar a sua adoção.

## 7. Conclusão

Este estudo avaliou a eficácia da higienização dos tetos com escovas mecânicas em comparação com protocolos convencionais, com base na redução da carga bacteriana total e de enterobactérias medido através da realização de zaragatoas dos tetos antes e após a sua higienização. Verificou-se que todos os protocolos, independentemente da exploração, reduziram significativamente a carga bacteriana após a higienização.

No entanto, apenas em algumas situações as escovas mecânicas demonstraram eficácia superior à do protocolo convencional, nomeadamente na exploração A (para ambos os indicadores) e na exploração B (para enterobactérias), ambas explorações que associavam a realização de um *pre-dipping* à utilização das escovas mecânicas. Na exploração C, onde as escovas foram usadas isoladamente, não se observaram diferenças significativas entre os dois protocolos. Estes resultados indicam que a associação das escovas a um pré-tratamento com um desinfetante complementar pode potenciar a sua eficácia. Apesar de a comparação com o estudo de Baumberger et al. (2016) confirmar a coerência dos resultados, o reduzido tamanho amostral e a influência de variáveis como o tipo de desinfetante, a sua concentração, o material de cama e a programação das escovas devem ser tidas em conta no momento da interpretação dos resultados.

Conclui-se que as escovas mecânicas são eficazes na redução da carga bacteriana, podendo constituir uma alternativa válida aos protocolos convencionais, especialmente quando integradas num protocolo combinado. Contudo, a sua eficácia depende de múltiplos fatores operacionais, sendo importante realizar estudos mais abrangentes que incluam maior dimensão amostral e a avaliação de outros parâmetros, como a qualidade do leite, a integridade da pele dos tetos e o custo-benefício dos diferentes protocolos.

## 8. Referências Bibliográficas

- Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):2001–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- Barkema HW, Von Keyserlingk MAG, Kastelic JP, Lam TJGM, Luby C, Roy J-P, LeBlanc SJ, Keefe GP, Kelton DF. 2015. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of Dairy Science*. 98(11):7426–7445. doi:10.3168/jds.2015-9377.
- Baumberger C, Guarín JF, Ruegg PL. 2016. Effect of 2 different premilking teat sanitation routines on reduction of bacterial counts on teat skin of cows on commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 99(4):2915–2929. doi:10.3168/jds.2015-10003.
- Besier J, Lind O, Bruckmaier RM. 2016. Dynamics of teat-end vacuum during machine milking: types, causes and impacts on teat condition and udder health – a literature review. *Journal of Applied Animal Research*. 44(1):263–272. doi:10.1080/09712119.2015.1031780.
- Blowey R, Edmondson P. 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds*. 2nd Edition. Oxfordshire (UK): CABI.
- Boddie RL, Nickerson SC, Adkinson RW. 2000. Efficacies of Chlorine Dioxide and Iodophor Teat Dips During Experimental Challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Science*. 83(12):2975–2979. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75197-6.
- Boomsma B, Bikker E, Lansdaal E, Stuu P. 2015. L-Lactic Acid – A Safe Antimicrobial for Home - and Personal Care Formulations. *SOFW Journal* [Internet]. [accessed 2025 June 3]; 15(141):1-5. [https://www.corbion.com/-/media/corbion/files/pla-pdfs-14-of-24/corbion\\_a\\_safe\\_antimicrobial\\_for\\_hpc\\_applications\\_eng\\_434618.pdf](https://www.corbion.com/-/media/corbion/files/pla-pdfs-14-of-24/corbion_a_safe_antimicrobial_for_hpc_applications_eng_434618.pdf)
- Breen J. 2019. The importance of teat disinfection in mastitis control. *Livestock*. 24(3):122–128. doi:10.12968/live.2019.24.3.122.
- Bruckmaier RM, Blum JW. 1996. Simultaneous recording of oxytocin release, milk ejection and milk flow during milking of dairy cows with and without prestimulation. *Journal of Dairy Research*. 63(2):201–208. doi:10.1017/S0022029900031708.
- Bruckmaier RM, Hilger M. 2001. Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder filling. *Journal of Dairy Research*. 68(3):369–376. doi:10.1017/S0022029901005015.
- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. 2017. *Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. 11th Edition. St. Louis (Mo): Elsevier.
- de Jong E, McCubbin KD, Speksnijder D, Dufour S, Middleton JR, Ruegg PL, Lam TJGM, Kelton DF, McDougall S, Godden SM, et al. 2023. Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 106(6):3761–3778. doi:10.3168/jds.2022-22826.

- Dee Falls A, Magee C. 2018. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. 8th Edition. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell.
- [DGAV] Direção-Geral da Alimentação e Veterinária. 2020. Lista de Biocidas de Uso Veterinário Autorizados [Internet]. [accessed 2025 January 26]. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/01/LISTA-DE-BIOCIDAS-DE-USO-VETERINARIO-AUTORIZADOS-dezembro-2020.pdf>
- Douphrate DI, Fethke NB, Nonnenmann MW, Rodriguez A, Hagevoort GR, Gimeno Ruiz De Porras D. 2016. Effect of a novel teat preparation system on upper extremity muscle activity among U.S. large-herd dairy parlor workers. *International Journal of Industrial Ergonomics*. 56:161–169. doi:10.1016/j.ergon.2016.10.003.
- Elmoslemany AM, Keefe GP, Dohoo IR, Wichtel JJ, Stryhn H, Dingwell RT. 2010. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*. 95(1–2):32–40. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.03.007.
- Enger BD, Fox LK, Gay JM, Johnson KA. 2015. Reduction of teat skin mastitis pathogen loads: Differences between strains, dips, and contact times. *Journal of Dairy Science*. 98(2):1354–1361. doi:10.3168/jds.2014-8622.
- European Standard EN 1656:2009. 2009. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization. Brussels.
- European Union. 2019. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC [Internet]. [place unknown]: Official Journal of the European Union; [accessed 2025 January 28]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006>
- Farrell S, Benson T, McKernan C, Regan Á, Burrell AMG, Dean M. 2023. Factors influencing dairy farmers' antibiotic use: An application of the COM-B model. *Journal of Dairy Science*. 106(6):4059–4071. doi:10.3168/jds.2022-22263.
- Fernandes S, Pereira G, Bexiga R. 2023. Bimodal milk flow and overmilking in dairy cattle: risk factors and consequences. *Animal*. 17(3):100716. doi:10.1016/j.animal.2023.100716.
- Fitzpatrick SR, Garvey M, Flynn J, Jordan K, Gleeson D. 2019. Are some teat disinfectant formulations more effective against specific bacteria isolated on teat skin than others? *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61(1):21. doi:10.1186/s13028-019-0455-3.
- Fitzpatrick SR, Garvey M, Flynn J, O'Brien B, Gleeson D. 2021a. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*. 74(1):1. doi:10.1186/s13620-020-00179-7.
- Fitzpatrick SR, Garvey M, Flynn J, O'Brien B, Gleeson D. 2021b. Effect of Pre-Milking Teat Foam Disinfection on the Prevention of New Mastitis Rates in Early Lactation. *Animals*. 11(9):2582. doi:10.3390/ani11092582.
- Fonseca MEB, Mourão AM, Chagas JDR, Ávila LM, Marques TLP, Baêta BA, Moraes RFF, Roier ECR. 2021. Mastite bovina: Revisão. *Pubvet*. 15(02). doi:10.31533/pubvet.v15n02a743.1-18.

- Galton DM, Petersson LG, Merrill WG, Bandler DK, Shuster DE. 1984. Effects of Premilking Udder Preparation on Bacterial Population, Sediment, and Iodine Residue in Milk. *Journal of Dairy Science*. 67(11):2580–2589. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81616-1.
- GEA. 2023. FutureCow Prep System [Internet]. [accessed 2025 January 11]. <https://www.gea.com/en/assets/295525/>
- Gleeson D, Flynn J, Brien BO. 2018. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. *Irish Veterinary Journal*. 71(1):11. doi:10.1186/s13620-018-0122-4.
- Gleeson D, O'Brien B, Flynn J, O'Callaghan E, Galli F. 2009. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. *Irish Veterinary Journal*. 62(7):461. doi:10.1186/2046-0481-62-7-461.
- Godden SM, Royster E. 2025. Bedding Management with a View to Promoting Udder Health. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 41(2):237–248. doi:10.1016/j.cvfa.2025.02.007.
- Godden SM, Royster E, Knauer W, Sorg J, Lopez-Benavides M, Schukken Y, Leibowitz S, French EA. 2016. Randomized noninferiority study evaluating the efficacy of a postmilking teat disinfectant for the prevention of naturally occurring intramammary infections. *Journal of Dairy Science*. 99(5):3675–3687. doi:10.3168/jds.2015-10379.
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 44(2):121–129. doi:10.1016/S0167-7012(00)00241-4.
- Hiley R, May R, Kingston C, Ohnstad I. [date unknown]. An Evaluation of Bacterial Count in a liner before and after spraying with Peracetic Acid Solution. <https://ambic.co.uk/wp-content/uploads/2016/08/An-Evaluation-of-Bacterial-Count-in-a-liner-before-and-after-spraying-with-Peracetic-Acid-Solution-Poster-Abstract-Engl1.pdf>
- Hogan C, Kinsella J, O'Brien B, Markey A, Beecher M. 2022. Estimating the effect of different work practices and technologies on labor efficiency within pasture-based dairy systems. *Journal of Dairy Science*. 105(6):5109–5123. doi:10.3168/jds.2021-21216.
- Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Todhunter DA, Schoenberger PS, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL, et al. 1989. Bacterial Counts in Bedding Materials Used on Nine Commercial Dairies. *Journal of Dairy Science*. 72(1):250–258. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79103-7.
- Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. 2004. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. *Journal of Dairy Science*. 87(10):3561–3573. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73493-1.
- Kelly P, O'Sullivan K, Berry D, More S, Meaney W, O'Callaghan E, O'Brien B. 2009. Farm management factors associated with bulk tank somatic cell count in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*. 62(S4):S45. doi:10.1186/2046-0481-62-S4-S45.
- Lago A, Godden SM. 2018. Use of Rapid Culture Systems to Guide Clinical Mastitis Treatment Decisions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 34(3):389–412. doi:10.1016/j.cvfa.2018.06.001.

- Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*. 94(9):4441–4456. doi:10.3168/jds.2010-4046.
- McDonnell G, Russell AD. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1):147–179. doi:10.1128/CMR.12.1.147.
- Middleton JR, Fox LK, Pighetti, Petersson-Wolfe C. 2017. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. 3rd Edition. New Prague (Mn): NMC.
- Mišeikienė R, Rudejevienė J, Gerulis G. 2015. Effect of pre-milking antiseptic treatment on the bacterial contamination of cow teats' skin. *BJVM*.:159–166. doi:10.15547/bjvm.833.
- Morton JM, Penry JF, Malmo J, Mein GA. 2014. Premilking teat disinfection: Is it worthwhile in pasture-grazed dairy herds?. *Journal of Dairy Science*. 97(12):7525–7537. doi:10.3168/jds.2014-8185.
- Müller S, Nitz J, Tellen A, Klocke D, Krömker V. 2023. Effect of Antibiotic Compared to Non-Antibiotic Dry Cow Treatment on the Bacteriological Cure of Intramammary Infections during the Dry Period - A Retrospective Cross-Sectional Study. *Antibiotics*. 12(429). doi:10.3390/antibiotics12030429.
- [NMC] National Mastitis Council. 2013. Recommended Milking Procedures [Internet]. [accessed 2025 January 29]. <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/09/Recommended-Milking-Procedures.pdf>
- Neeser NL, Hueston WD, Godden SM, Bey RF. 2006. Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228(2):254–260. doi:10.2460/javma.228.2.254.
- Niero TR, Kappes R, Scheid AL, Ramos AF, Ribeiro EB, Cardozo LL, Ferraz SM, Thaler Neto A. 2024. Effect of double-premilking teat disinfection protocols on bacterial counts on teat skin of cows and milker gloves in a free-stall-housed dairy herd. *Journal of Dairy Research*. 91(3):311–314. doi:10.1017/S0022029924000335.
- Northern Dairy Equipment LTD. [date unknown]. Sanicleanse Teat Scrubber System [Internet]. [accessed 2025 January 11]. <https://dairy-equipment.co.uk/wp-content/uploads/Northern-Dairy-Sanicleanse-Auto.pdf>
- Oliver SP, Gillespie BE, Lewis MJ, Ivey SJ, Almeida RA, Luther DA, Johnson DL, Lamar KC, Moorehead HD, Dowlen HH. 2001. Efficacy of a New Premilking Teat Disinfectant Containing a Phenolic Combination for the Prevention of Mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84(6):1545–1549. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)70189-0.
- Ózsvári L, Ivanyos D. 2022. The use of teat disinfectants and milking machine cleaning products in commercial Holstein-Friesian farms. *Frontiers in Veterinary Science*. 9:956843. doi:10.3389/fvets.2022.956843.
- Pankey JW. 1989. Premilking Udder Hygiene. *Journal of Dairy Science*. 72(5):1308–1312. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79238-9.
- Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. 2019. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder

- health in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 102(11):10213–10234. doi:10.3168/jds.2019-16692.
- Pfeilsticker H-U, Bruckmaier RM, Blum JW. 1996. Cisternal milk in the dairy cow during lactation and after preceding teat stimulation. *Journal of Dairy Research*. 63(4):509–515. doi:10.1017/S0022029900032040.
- Ricke S. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*. 82(4):632–639. doi:10.1093/ps/82.4.632.
- Robles I, Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Roy JP, Von Keyserlingk MAG, DeVries TJ. 2020. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *Animal*. 14(5):1052–1066. doi:10.1017/S1751731119002787.
- Rodrigues ACO, Ruegg PL. 2005. Actions and Outcomes of Wisconsin Dairy Farms Completing Milk Quality Teams. *Journal of Dairy Science*. 88(7):2672–2680. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72944-1.
- Rodriguez Z, Lopez-Benavides M, Gentilini MB, Ruegg PL. 2025. Impact of training dairy farm personnel on milking routine compliance, udder health, and milk quality. *Journal of Dairy Science*. 108(2):1615–1624. doi:10.3168/jds.2024-25609.
- Ruegg PL. 2012. New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28(2):149–163. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.001.
- Ruegg PL. 2021. What Is Success? A Narrative Review of Research Evaluating Outcomes of Antibiotics Used for Treatment of Clinical Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*. 8:639641. doi:10.3389/fvets.2021.639641.
- Ruegg PL. 2020. Understanding the economic impact of mastitis therapy – the role of duration and drug selection. *AABP Proceedings*. 53(1):84-91. <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/AABP/article/view/7976/7565>
- Schadt I. 2023. Health concerns about possible long-term effects of legally marketed milk and dairy from animals with intramammary infections. *Frontiers in Public Health*. 11:1200924. doi:10.3389/fpubh.2023.1200924.
- Serrenho R. 2015. Caracterização da Qualidade do Leite e Comparação do Impacto Económico das Mastites em Três Bacias Leiteiras em Portugal – Ilha de S. Miguel – Açores, Entre-Douro-e-Minho e Região Centro [master's thesis]. Lisboa: FMV-UL.
- Tsai K, Hoffmann V, Simiyu S, Cumming O, Borsay G, Baker KK. 2022. Bacteroides Microbial Source Tracking Markers Perform Poorly in Predicting Enterobacteriaceae and Enteric Pathogen Contamination of Cow Milk Products and Milk-Containing Infant Food. *Frontiers in Microbiology*. 12:778921. doi:10.3389/fmicb.2021.778921.
- Vargova M, Vyrostkova J, Lakticova K, Zigo F. 2023. Effectiveness of sanitation regime in a milking parlour to control microbial contamination of teats and surfaces teat cups'. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 30(1):55–60. doi:10.26444/aaem/161037.
- Watters RD, Schuring N, Erb HN, Schukken YH, Galton DM. 2012. The effect of premilking udder preparation on Holstein cows milked 3 times daily. *Journal of Dairy Science*. 95(3):1170–1176. doi:10.3168/jds.2011-4388.

- Weiss D, Bruckmaier RM. 2005. Optimization of Individual Prestimulation in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 88(1):137–147. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72671-0.
- Williamson JH, Lacy-Hulbert SJ. 2013. Effect of disinfecting teats post-milking or pre- and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. *New Zealand Veterinary Journal*. 61(5):262–268. doi:10.1080/00480169.2012.751576.
- Yeiser EE, Leslie KE, McGilliard ML, Petersson-Wolfe CS. 2012. The effects of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis and flunixin meglumine administration on activity measures, feed intake, and milk parameters. *Journal of Dairy Science*. 95(9):4939–4949. doi:10.3168/jds.2011-5064.

## 9. Anexos

### Anexo I - Resultados das Validações

**Tabela 6: Validação da ausência de toxicidade do 1º lote de neutralizador**

	Validação da Ausência de Toxicidade (25/3)					
	Staph aureus		Strep uberis		E. coli	
	Teste	Controlo	Teste	Controlo	Teste	Controlo
Placa 1	341	344	165	168	309	301
Placa 2	329	324	167	153	295	292
Média	335	334	166	160,5	302	296,5

**Tabela 7: Validação da eficácia de neutralização do 1º lote de neutralizador**

	Validação da Eficácia de Neutralização (31/3)								
	Staph aureus			Strep uberis			E. coli		
	Iodo	Escovas	Controlo	Iodo	Escovas	Controlo	Iodo	Escovas	Controlo
Placa 1	361	340	351	405	413	417	212	203	218
Placa 2	333	369	366		409	391	198	214	201
Média	347	354,5	358,5	405	411	404	205	208,5	209,5

**Tabela 8: Validação da ausência de toxicidade do 2º lote de neutralizador**

	Validação da Ausência de Toxicidade (8/4)					
	Staph aureus		Strep uberis		E. coli	
	Teste	Controlo	Teste	Controlo	Teste	Controlo
Placa 1	362	351	394	405	298	290
Placa 2	353	355	379	392	286	288
Média	357,5	353	386,5	398,5	292	289

**Tabela 9: Validação da eficácia de neutralização do 2º lote de neutralizador**

	Validação da Eficácia de Neutralização (7/4)								
	Staph aureus			Strep uberis			E. coli		
	Iodo	Escovas	Controlo	Iodo	Escovas	Controlo	Iodo	Escovas	Controlo
Placa 1	379	401	371	408	415	421	291	307	302
Placa 2	386	380	387	421	409	416	284	284	300
Média	382,5	390,5	379	414,5	412	418,5	287,5	295,5	301

## Anexo II - Resumo da Estatística Descritiva

Tabela 10: Estatística descritiva dos resultados após 24 horas de incubação

Grupo	n	Contagem Total de Bactérias			Contagem de Bactérias Coliformes		
		PRE (log10)	POST (log10)	RED (log10)	PRE (log10)	POST (log10)	RED (log10)
A- Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,5341	3,7861	2,748	3,6388	2,6692	0,9696
	Desvio padrão	0,4694	1,1755	1,3240	0,5255	0,4798	0,3377
	Mediana	6,3506	3,3511	3,1963	3,6505	2,4945	0,9178
	Mínimo	5,9420	2,6990	0,1871	2,7202	2,1761	0,4771
	Máximo	7,3570	6,5119	4,1666	4,6990	3,7597	1,4260
Int. interquartis	0,6922	1,2897	1,9776	0,5659	0,5406	0,6524	
A- Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	5,8182	4,3981	1,4201	3,3575	2,8286	0,5288
	Desvio padrão	0,5911	0,7882	0,5336	0,3076	0,3053	0,2900
	Mediana	5,7959	4,4460	1,3133	3,4106	2,8126	0,4476
	Mínimo	5,1055	3,1833	0,7747	2,8293	2,4393	0,1413
	Máximo	6,8893	5,4108	2,6126	3,8451	3,5119	1,0158
Int. interquartis	0,9538	1,5212	0,5675	0,3812	0,3671	0,4959	
B- Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	5,5931	4,1078	1,4853	3,6162	2,7970	0,8192
	Desvio padrão	0,4544	0,7271	0,6330	0,2749	0,3162	0,3785
	Mediana	5,6136	4,1731	1,4749	3,6532	2,7492	0,7597
	Mínimo	4,8751	3,0107	0,2553	3,2553	2,4771	0,3415
	Máximo	6,2041	5,6990	2,3740	4,1761	3,3118	1,3188
Int. interquartis	0,7592	0,7594	0,9332	0,4280	0,6263	0,8290	
B- Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	5,7193	4,2908	1,4285	3,7147	3,2420	0,4728
	Desvio padrão	0,4523	0,5169	0,4229	0,4713	0,3012	0,3362
	Mediana	5,7022	4,3531	1,4500	3,7641	3,2973	0,3727
	Mínimo	5,1055	3,2788	0,9031	2,9165	2,6767	0,0706
	Máximo	6,2730	4,9890	2,2653	4,3617	3,6284	1,0344
Int. interquartis	0,8871	0,7308	0,5476	0,7190	0,5156	0,5341	
C- Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,3383	5,1630	1,1752	3,6372	3,0230	0,6141
	Desvio padrão	0,9452	0,6054	1,0551	0,4473	0,4285	0,6507
	Mediana	6,4292	5,0692	1,3345	3,6844	3,0285	0,7096
	Mínimo	5,0881	4,3064	-0,6715	2,7959	2,4771	-0,8573
	Máximo	7,9294	6,0969	3,1335	4,1688	3,6532	1,5488
Int. interquartis	1,6288	1,1101	1,3156	0,7013	0,8301	0,6820	
C- Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,1369	4,8741	1,2629	3,5961	3,2239	0,3722
	Desvio padrão	0,9967	0,6977	0,9021	0,6417	0,5292	0,3608
	Mediana	5,9974	4,7701	1,0090	3,8183	3,3567	0,3556
	Mínimo	5,1055	4,0512	0,5315	2,5740	2,5441	0,0049
	Máximo	7,9031	6,0512	3,5757	4,2956	3,9777	1,1761
Int. interquartis	1,8743	0,9791	0,6712	1,0525	1,0472	0,5465	

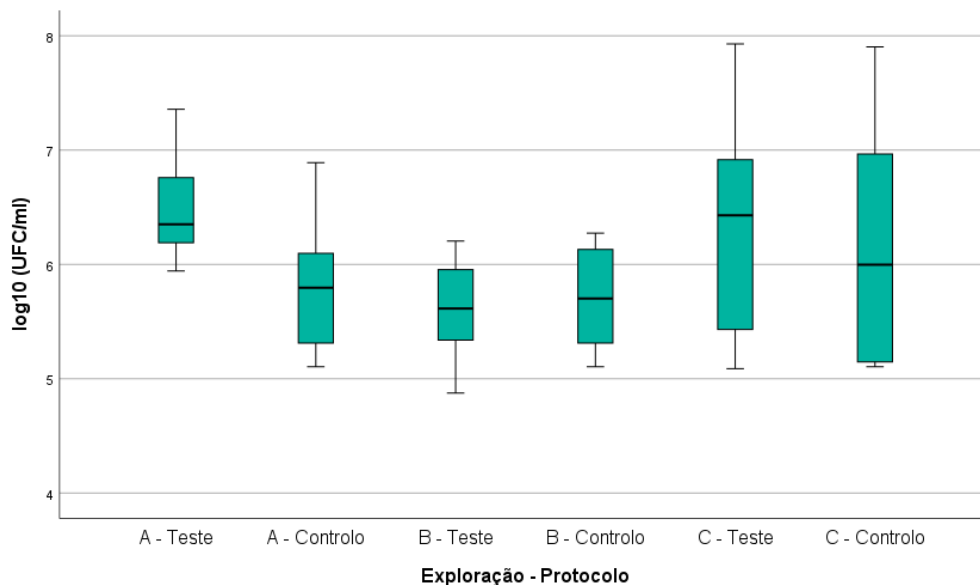
**Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados após 48 horas de incubação**

Grupo	n	Contagem Total de Bactérias			Contagem de Bactérias Coliformes		
		PRE(log10)	POST(log10)	RED (log10)	PRE(log10)	POST(log10)	RED (log10)
A - Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	7,0633	4,2229	2,8405	4,1507	2,9473	1,2034
	Desvio padrão	0,3938	1,2701	1,3580	0,5847	0,6208	0,6042
	Mediana	6,9252	3,7245	3,0762	4,2693	2,6021	1,0664
	Mínimo	6,7202	3,0700	0,1530	3,1222	2,4771	0,5579
	Máximo	7,9777	7,0512	4,3245	4,8451	4,0700	2,1181
	Int. interquartis	0,4588	1,2402	1,7817	1,0177	1,0397	1,1002
A - Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,3252	4,8700	1,4553	3,6417	3,1069	0,5348
	Desvio padrão	0,7349	0,8436	0,5772	0,4399	0,2570	0,3862
	Mediana	6,1647	5,0538	1,2695	3,5862	3,0961	0,4876
	Mínimo	5,3375	3,7202	0,8877	3,0414	2,7404	0,0753
	Máximo	7,6284	5,9777	2,4500	4,3979	3,6532	1,2366
	Int. interquartis	1,1470	1,7045	0,9017	0,6890	0,2744	0,6152
B - Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,0397	4,5331	1,5066	3,9396	3,0694	0,8702
	Desvio padrão	0,5384	0,7723	0,5475	0,4203	0,4231	0,3779
	Mediana	6,0692	4,6867	1,4604	3,8918	3,0309	0,8428
	Mínimo	5,2240	3,5119	0,7248	3,4314	2,5740	0,4206
	Máximo	6,8129	6,0881	2,4616	4,8751	3,7782	1,5315
	Int. interquartis	0,8951	1,2130	0,9016	0,5572	0,6007	0,6940
B - Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,2394	4,7504	1,4889	4,0497	3,5832	0,4666
	Desvio padrão	0,5752	0,5687	0,5966	0,482	0,3749	0,3116
	Mediana	6,2853	5,0201	1,4167	4,0106	3,6519	0,3699
	Mínimo	5,3375	3,5740	0,6385	3,3711	2,9661	0,1461
	Máximo	6,9542	5,2900	2,7924	4,7959	4,1761	1,1326
	Int. interquartis	0,9725	0,7110	0,7354	0,8185	0,6158	0,4176
C - Teste	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,5942	5,5663	1,0278	3,9883	3,465	0,5233
	Desvio padrão	0,9866	0,4615	0,9663	0,3954	0,4475	0,7275
	Mediana	6,6528	5,4644	1,1431	4,1109	3,5430	0,6394
	Mínimo	5,1222	4,9542	-0,7381	3,1383	2,6284	-1,0155
	Máximo	8,3473	6,3222	2,9626	4,4065	4,1538	1,7782
	Int. interquartis	1,3971	0,7542	0,8751	0,5171	0,6887	0,7630
C - Controlo	10	10	10	10	10	10	10
	Média	6,6115	5,3431	1,2684	4,1040	3,5785	0,5255
	Desvio padrão	0,9490	0,5230	0,7778	0,3889	0,4372	0,2942
	Mediana	6,6493	5,1312	1,0624	4,1608	3,6844	0,4946
	Mínimo	5,2304	4,7404	0,4344	3,4548	2,7202	0,1963
	Máximo	8,1222	6,1761	3,0430	4,6284	4,0107	1,2093
	Int. interquartis	1,2669	1,0091	1,0453	0,5635	0,7999	0,3546

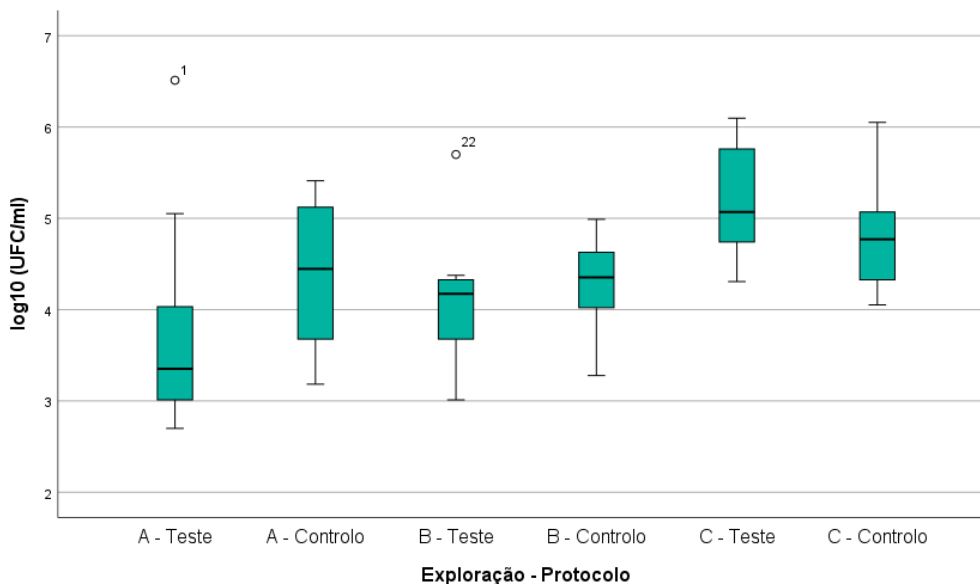
## Anexo III - Resultados

### Resultados - 24 horas

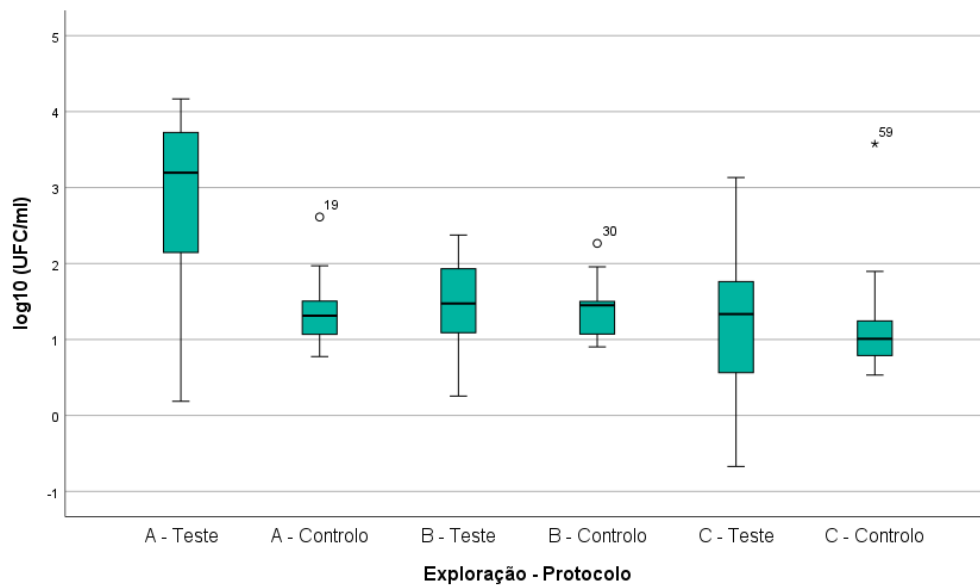
**Gráfico 7: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pré-higienização em meio TSA**



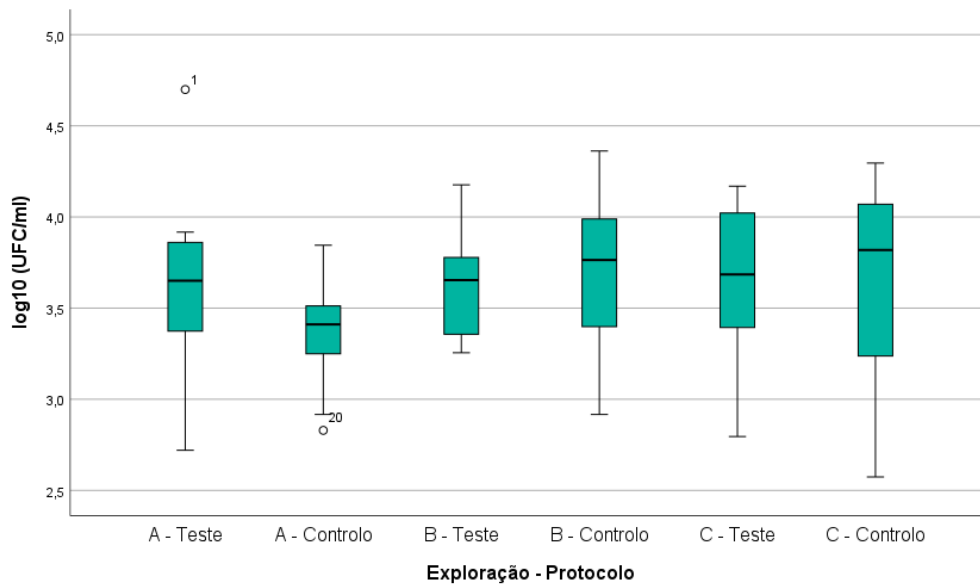
**Gráfico 8: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pós-higienização em meio TSA**



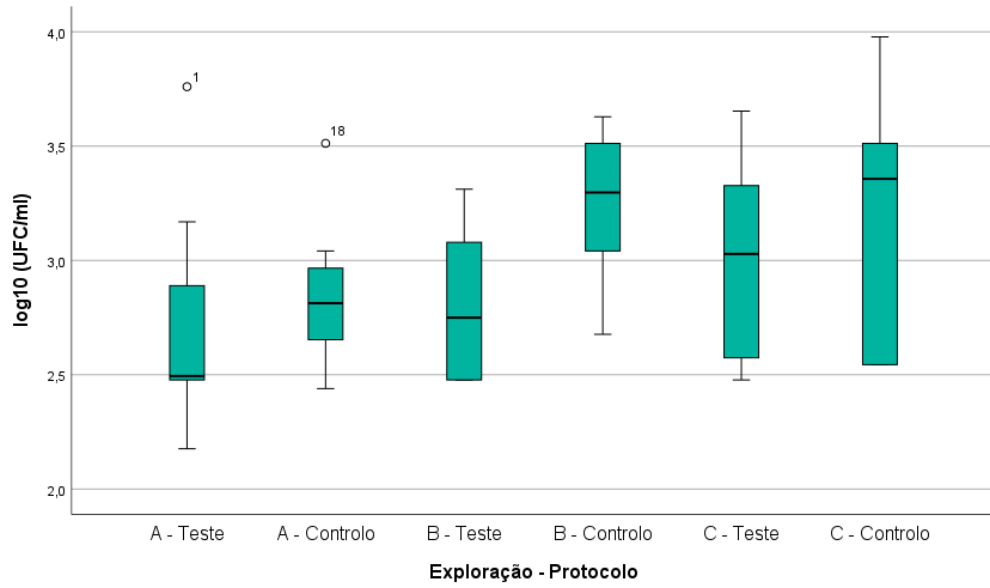
**Gráfico 9: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana em meio TSA**



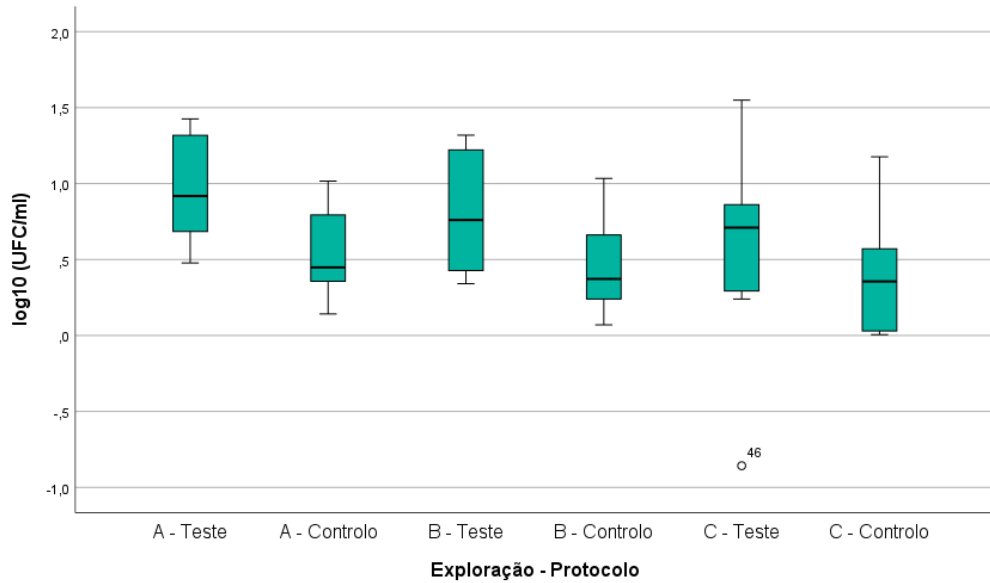
**Gráfico 10: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pré-higienização em meio MCK**



**Gráfico 11: Gráfico box-plot da quantificação bacteriana logarítmica pós-higienização em meio MCK**



**Gráfico 12: Gráfico box-plot da redução logarítmica da quantificação bacteriana em meio MCK**



**Tabela 12: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação bacteriana total)**

Exploração	Teste de Mann-Whitney (contagens PRE, Teste vs Controle) (p)	Teste de Wilcoxon (PRE vs POST) (p)	Teste de Mann-Whitney (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)	Teste de Levene (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)
A	0,077	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,023	0,024
B	0,631	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,705	0,200
C	0,684	Teste = 0,013 Controle = 0,005	0,783	0,471

**Tabela 13: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação de enterobactérias)**

Exploração	Teste de Mann-Whitney (contagens PRE, Teste vs Controle) (p)	Teste de Wilcoxon (PRE vs POST) (p)	Teste de Mann-Whitney (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)	Teste de Levene (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)
A	0,702	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,013	0,421
B	0,654	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,041	0,550
C	0,604	Teste = 0,037 Controle = 0,005	0,082	0,314

**Tabela 14: Testes estatísticos utilizados na comparação das explorações**

Meio de Cultura	Teste de Kruskal-Wallis (contagens PRE) (p)	Teste de Dunn (explorações A e B) (p)	Teste de Dunn (explorações B e C) (p)	Teste de Dunn (explorações A e C) (p)
TSA	0,041	0,067	0,114	1,000
MCK	0,365			

## Resultados - 48 horas

**Tabela 15: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação bacteriana total)**

Exploração	Teste de Mann-Whitney (contagens PRE, Teste vs Controle) (p)	Teste de Wilcoxon (PRE vs POST) (p)	Teste de Mann-Whitney (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)	Teste de Levene (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)
A	0,059	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,028	0,062
B	0,353	Teste = 0,005 Controle = 0,005	0,880	0,942
C	0,912	Teste = 0,013 Controle = 0,005	0,597	0,750

**Tabela 16: Testes estatísticos utilizados na comparação dos grupos de cada exploração (quantificação de enterobactérias)**

Exploração	Teste de Mann-Whitney (contagens PRE, Teste vs Controle) (p)	Teste de Wilcoxon (PRE vs POST) (p)	Teste de Mann-Whitney (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)	Teste de Levene (redução logarítmica, Teste vs Controle) (p)
A	0,052	Teste = 0,005 Controlo = 0,005	0,005	0,062
B	0,684	Teste = 0,005 Controlo = 0,005	0,028	0,470
C	0,684	Teste = 0,047 Controlo = 0,005	0,705	0,110

**Tabela 17: Testes estatísticos utilizados na comparação das explorações**

Meio de Cultura	Teste de Kruskal-Wallis (contagens PRE) (p)	Teste de Dunn (explorações A e B) (p)	Teste de Dunn (explorações B e C) (p)	Teste de Dunn (explorações A e C) (p)
TSA	0,024	0,028	0,129	1,000
MCK	0,534			

## Resultados - Comparação dos Ordenhadores

**Tabela 18: Testes estatísticos utilizados na comparação da eficácia de higienização dos diferentes ordenhadores de cada exploração**

Exploração	Meio de Cultura TSA (24 horas de incubação) (p)	Meio de Cultura MCK (24 horas de incubação) (p)	Meio de Cultura TSA (48 horas de incubação) (p)	Meio de Cultura MCK (48 horas de incubação) (p)
A	0,916	0,834	0,831	0,522
B	0,074	0,138	0,917	0,076
C	0,651	0,257	0,239	0,186