

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**RAISSA BARROS GRACIE MERY**

**UTILIZAÇÃO DO OZÔNIO “*in vitro*” E “*in vivo*” EM *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE VACAS E BÚFALAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

**ILHÉUS-BAHIA**

**2019**

**RAISSA BARROS GRACIE MERY**

**UTILIZAÇÃO DO OZÔNIO “*in vitro*” E “*in vivo*” EM *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE VACAS E BÚFALAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poliana de Castro Melo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Soraia V. Matarazzo

**ILHÉUS-BAHIA**

**2019**

**RAISSA BARROS GRACIE MERY**

**UTILIZAÇÃO DO OZÔNIO “*in vitro*” E “*in vivo*” EM *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE VACAS E BÚFALAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

Ilhéus – BA, 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

---

Poliana de Castro Melo – DSc

UESC/DCAA

(Orientadora)

---

Soraia Vanessa Matarazzo – DSc

UESC/DCAA

(Co-orientadora)

---

Jane Lima dos Santos– DSc

UESC/DCB

---

Denise Von Dolinger de Brito Röder– DSc

UFU

**ILHÉUS – BAHIA**

**2019**

## DEDICATÓRIA

A minha família e queridos amigos que tanto  
Contribuíram para a realização deste trabalho,  
Trago um pedacinho de cada comigo.

*“O todo é maior do que a simples soma das suas partes”*

Aristóteles

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão ao meu companheiro e marido Leonardo Maia, por todo incentivo, dedicação e ajuda ao longo dessa etapa na minha vida.

A minha família, minha mãe Mayana Barros, meu pai Riller Gracie, meus irmãos Rairon e Neto, por todo apoio e amor.

A minha orientadora Poliana Melo, por acreditar e tornar possível este trabalho, agregando conhecimentos e experiências que tanto me acrescentaram no meu desenvolvimento como pesquisadora e pessoa.

A coorientadora Soraia Matarazzo por toda ajuda e apoio no desenvolvimento do projeto.

A grande amiga dessa e outras vidas que o mestrado me trouxe, Samanta Pellizzoni, a qual foi fundamental e nas horas mais difíceis me deu forças para continuar.

A Hortênci Mazzo, que tanto me incentivou nessa jornada e que mesmo distante sempre se fez presente em minha vida, e que assim permaneça sempre.

A colega de mestrado Thaíse Alves que compartilhou de forma tão caridosa seu vasto conhecimento, e que tanto me acrescentou. Não medindo esforços em ajudar o próximo.

As pessoas que estiveram ao longo desses dois anos me auxiliando dentro do laboratório e que foram fundamentais no processamento das amostras, a Fabiana, a Camila Gil, as queridas IC's Tarciana, Mariana e Amanda, aos voluntários Henrique, Fernanda e Elvio.

A Sonia Lopo que acreditou nessa pesquisa disponibilizando seu rebanho e todos os colaboradores das fazendas do experimento, Jazon, Jabinho, Nilton, Carlos, Marquinhos, Arnaldo, Ailton e Mario que com todo cuidado, simplicidade e carinho fizeram desta trabalhosa etapa a melhor.

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, em nome de todos os professores que a compõem.

A UESC pelo apoio.

A FAPESB pela bolsa e incentivo a pesquisa, possibilitando novas perspectivas e desenvolvimento de conhecimentos para a sociedade.

## UTILIZAÇÃO DO OZÔNIO “*in vitro*” E “*in vivo*” EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE VACAS E BÚFALAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

### RESUMO

A mastite subclínica permanece como um desafio na pecuária leiteira, provocando prejuízos na produção e afetando a saúde pública. O principal agente etiológico da mastite subclínica é o *Staphylococcus aureus*. A ozonioterapia se apresenta como alternativa de tratamento de baixo custo e eficaz no período de lactação. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito do ozônio “*in vivo*” e “*in vitro*” em *Staphylococcus aureus* isolados de vacas e búfalas com mastite subclínica. Os animais foram selecionados pelo *California Mastitis Test* sendo avaliados 36 quartos mamários de vacas bovinas, e 27 de búfalas. Nas avaliações “*in vivo*” os animais receberam 5 aplicações diárias de 60ml de ozônio a 44mcg/l e foram monitorados através do *California Mastitis Test* e coleta do leite para Unidades Formadoras de Colônias em 4 períodos observacionais (Dia 0, dia 10, dia 20, dia 30). No dia 10; 38% das vacas e 59,25% das búfalas zeraram na contagem de Unidades Formadoras de Colônias na amostra de leite; no dia 20; a contagem Unidades Formadoras de Colônias das amostras de vacas não zeraram, já nas amostras de búfalas 92,59% zeraram; no dia 30 as vacas obtiveram 38% e as búfalas 66,66% de amostras zeradas. Quando comparados os períodos D10, D20, D30, para vacas bovinas no período D10 a aplicação do ozônio “*in vivo*” foi mais eficiente. Já para as búfalas o período D20 foi o que apresentou melhor resposta. Ao avaliar o monitoramento através do CMT, observou-se que tanto em vacas como em búfalas os períodos D10, D20, e D30 não apresentaram diferença estatística significativa, com valores superiores a  $p > 0,05$ . Na aplicação do ozônio “*in vitro*” 25% das amostras de vacas e 33% das de búfalas não apresentaram número de contagem bacteriana detectável, após aplicação do ozônio em placas de *petri*. Conclui-se que o ozônio é eficiente em reduzir o quadro de mastite subclínica e em alguns animais levou a eliminação do *S. aureus* durante o período de lactação tanto em búfalas como em vacas. Quanto a avaliação “*in vitro*” o ozônio teve ação bactericida e na maioria das amostras reduziu a contagem de *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Leite, ozonioterapia, resistência bacteriana, ruminantes, tratamento.

## USE OF OZONE ‘*IN VITRO*’ AND ‘*IN VIVO*’ ON *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM COWS AND BUFFALOES WITH SUBCLINICAL MASTITIS

### ABSTRACT

Subclinical mastitis remains a challenge in dairy farming, causing production losses and affecting public health. The main etiologic agent of subclinical mastitis is *Staphylococcus aureus*. Ozone therapy presents itself as a low-cost alternative and also an effective treatment during the lactation period. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of ozone "*in vivo*" and "*in vitro*" on isolated *Staphylococcus aureus*, from cows and buffaloes with subclinical mastitis. A total of 36 mammary quarters of bovine cows and 27 of buffaloes were evaluated. The animals received intramammary applications with 60ml of ozone at a dose of 44mcg/l each, daily applications for 5 days, and were monitored through the California Mastitis Test, and the Colony Forming Units milk sample, collected in 4 observational periods (Day 0, day 10, day 20, day 30). On the day 10; 38% of the cows and 59.25% of the buffaloes zeroed in the CFU count in the milk sample; on the day 20; the Colony Forming Units count of the cow samples did not clear, while in the buffalo samples 92.59% zeroed; on day 30 the cows obtained 38% and the buffalo 66.66% of zeroed samples. When comparing periods D10, D20, D30, for bovine cows in period D10 the application of ozone "*in vivo*" was more efficient. For the buffaloes, the D20 period was the one that presented the best response. When evaluating CMT monitoring, it was observed that in both cows and buffaloes, the periods D10, D20, and D30 did not present a significant statistical difference, with values greater than  $p > 0.05$ . In the application of ozone "*in vitro*" 25% of cow's samples and 33% of buffalo samples had no detectable bacterial counts after application of ozone to petri dishes. It is concluded that ozone is efficient in the treatment of *S. aureus* subclinical mastitis during the lactation period in both buffaloes and cows and it was able to reduce the *in vitro* *S. aureus* count.

**Keywords:** milk, ozonotherapy, resistant bacteria, ruminants, treatment.



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Comparativo do poder oxidativo do ozônio.....	21
<b>Tabela 2.</b> ANOVA da contagem de UFC em relação ao dia de observação e ao teto da vaca.....	37
<b>Tabela 3.</b> Análise de variância na contagem de UFC por dia de observação e tetos de búfalas.....	39
<b>Tabela 4.</b> Resultados de UFCs “ <i>in vitro</i> ” de isolados de <i>S. aureus</i> de leite de vacas e búfalas com mastite, submetidos ao gás ozônio.....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>California Mastitis Test</i> demonstrando 3 quartos negativos (sem formação de grumos) e 1 quarto positivo (com formação de grumos).....	27
<b>Figura 2.</b> Demonstração do período experimental e monitoramento após aplicação do ozônio nas vacas e búfalas. ....	28
<b>Figura 3.</b> Aplicação do ozônio em placa. ....	30
<b>Figura 4.</b> Placa ozonizada a esquerda e placa controle a direita. ....	31
<b>Figura 5.</b> Contagem de Unidade Formadora de Colônia. ....	31
<b>Figura 6.</b> Distribuição do resultado do monitoramento pelo teste CMT de vacas e búfalas.....	32
<b>Figura 7.</b> Variação da contagem de UFC por teto na propriedade de ordenha manual nos diferentes tempos de observação. ....	33
<b>Figura 8.</b> Variação da contagem de UFC por teto na propriedade de ordenha mecânica nos diferentes tempos de observação. ....	34
<b>Figura 9.</b> Distribuição da frequência absoluta dos tetos de vacas bovinas acometidos com <i>S. aureus</i> nos diferentes tempos de observação. ....	36
<b>Figura 10.</b> Distribuição da frequência percentual dos tetos de vacas bovinas acometidos com <i>S. aureus</i> nos diferentes tempos de observação. ....	36
<b>Figura 11.</b> Distribuição da frequência absoluta dos tetos de búfalas acometidos com <i>S. aureus</i> nos diferentes tempos de observação. ....	38
<b>Figura 12.</b> Distribuição da frequência percentual dos tetos de búfalas acometidos com <i>S. aureus</i> nos diferentes tempos de observação. ....	38
<b>Figura 13.</b> Regressão para UFCs de vacas e búfalas, no sul do estado da Bahia, submetidas a controle de mastite por 30 dias utilizando ozônioterapia. Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. ....	40
<b>Figura 14.</b> Comparação da contagem de UFC entre vacas e búfalas. ....	41
<b>Figura 15.</b> Comparação das contagens “ <i>in vitro</i> ” de UFC de <i>S. aureus</i> isolado de leite de vacas com mastite subclínica submetidos ao tratamento com ozônio. ....	43
<b>Figura 16.</b> Comparação das contagens “ <i>in vitro</i> ” de UFC de <i>S. aureus</i> isolado de leite de búfalas com mastite subclínica submetidos ao tratamento com ozônio. ....	43

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	OBJETIVOS .....	14
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1.	Leite .....	15
3.1.1.	Produção de leite no Brasil.....	15
3.1.2.	Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite .....	15
3.1.3.	Boas Práticas Agropecuária na produção Leiteira.....	16
3.1.4.	Mastite .....	16
3.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.2.1.	Características.....	17
3.2.2.	Fatores de virulência .....	18
3.2.3.	Interação <i>Staphylococcus aureus</i> e glândula mamária .....	18
3.2.4.	Importância na saúde pública.....	19
3.2.5.	Ocorrência no leite.....	20
3.3.	Ozônio.....	20
3.3.1.	Histórico.....	20
3.3.2.	Propriedades .....	21
3.3.3.	Produção do Ozônio .....	22
3.3.4.	Mecanismo de ação nas bactérias .....	22
3.3.5.	Aplicação em Vacas .....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.1.	Obtenção das amostras de leite Propriedade A .....	24
4.1.2.	Características da propriedade rural e do rebanho.....	24
4.1.3.	Propriedade B.....	25
4.1.3.1.	Características da propriedade rural e do rebanho .....	25
4.1.4.	Propriedade C.....	25
<b>4.1.4.1.</b>	<b>Características da propriedade rural e do rebanho .....</b>	<b>25</b>
4.2.	Seleção Animais .....	26
4.3.	Aplicação " <i>in vivo</i> " do ozônio .....	27
4.4.	Colheita e envio das amostras .....	28
4.5.	Isolamento e identificação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
4.6.	Aplicação " <i>In Vitro</i> " do ozônio nas amostras positivas para <i>S. aureus</i> .....	29

4.7. Contagem de unidades formadoras de colônia após aplicação do ozônio “ <i>in vivo</i> ”	30
4.8. Análise Estatística .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1. CMT em vacas e Búfalas “ <i>in vivo</i> ” .....	32
5.2. Vacas “ <i>in vivo</i> ” .....	33
5.3. Búfalas “ <i>in vivo</i> ” .....	38
5.4. Vacas e Búfalas “ <i>in vivo</i> ” .....	40
5.5. Vacas e Búfalas “ <i>in vitro</i> ” .....	42
6. CONCLUSÃO .....	44
7. REFERÊNCIAS .....	45
ANEXOS .....	51
ANEXO 1 .....	51
ANEXO 2 .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (RIISPOA art. 475, 2017).

O leite é um alimento de alto valor nutricional, fornecendo ao homem macro e micronutrientes indispensáveis ao seu crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. Como fonte de proteína, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, o leite torna-se um excelente meio para crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis.

Em condições sanitárias inadequadas durante as práticas leiteiras na propriedade, o leite pode ser contaminado e perder sua qualidade. Os microrganismos indesejáveis causam alterações físico-químicas e sensoriais e conseqüentemente problemas econômicos e de saúde pública.

Dentre as espécies encontradas no leite, o *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos com importância na saúde animal e humana. São bactérias Gram positivas, anaeróbicas facultativas, imóveis, não esporuladas e coagulase positivas (VANDERHAEGHEN, 2015). Pode ser carregado naturalmente intra e interespecies, sendo que a frequência encontrada naturalmente na superfície epitelial de humanos é, em média, de 20% (ACTON et al., 2009) e em vacas, entre 14% e 23% (NAGASE et al., 2002; ROBERSON et al., 1994).

Em termos de saúde pública, *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos que podem ser encontrados em alimentos de origem animal, especialmente no leite e seus derivados (OLIVEIRA et al., 2013, SANTANA, 2006, ALVES et al., 2009 NEDER et al., 2011), expondo a população consumidora ao risco de intoxicação alimentar pela ingestão de toxinas específicas produzidas pelo micro-organismo.

A toxina produzida por essas bactérias é termotolerante e pode ser encontrada em diversos alimentos como o leite, o qual mesmo pasteurizado pode levar a intoxicação apresentando sinais clínicos de diarreia, vômito e febre (OTTO, 2014).

Outro fator que expõe a saúde do consumidor é o uso extensivo e indiscriminado de antibióticos para efetivar o tratamento de mastite no rebanho leiteiro envolvendo riscos de resíduos assim como bactérias zoonóticas multirresistentes a antibióticos.

Estudos tem sido desenvolvidos com uso da ozonioterapia na mastite em ruminantes (COUTO, 2014; CÁFARO FILHO, 2014; PEREIRA, 2006). Segundo

Restaino et al. (1995), o ozônio tem se revelado um eficiente agente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. Porém, o nível de inativação microbiana pelo ozônio varia de acordo com o pH, temperatura e quantidade de matéria orgânica que circundam as células.

O ozônio é descrito como uma molécula com ação fungicida, viricida, bactericida e oxidante, o que lhe dá o poder de inativação e eliminação de microrganismos (SUNNEN, 2003).

Muitos são os benefícios da ozonioterapia, porém ainda não existe um consenso quanto a dose, quantidade de sessões e ação do ozônio sob os microrganismos, principalmente os biofilmes (ZANARDI, 2016), necessitando por tanto de maiores estudos sobre sua aplicabilidade em diferentes terapêuticas clínicas que visem fomentar a publicação de uma normativa que regulamente a prática dessa terapia na medicina veterinária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do ozônio "*in vitro*" e "*in vivo*" em *Staphylococcus aureus* isolados de vacas e búfalas com mastite subclínica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da ozonioterapia intramamária em vacas e búfalas leiteiras com mastite subclínica;
- Aplicar um protocolo de tratamento com ozônio na mastite subclínica;
- Avaliar "*in vitro*" o efeito do ozônio no crescimento dos *Staphylococcus aureus* isolados;
- Comparar os resultados do ozônio "*in vitro*" e "*in vivo*" em vacas e búfalas com mastite subclínica.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Leite**

##### **3.1.1. Produção de leite no Brasil**

A FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) apontou que a produção mundial de leite em 2016 foi de 798 milhões de toneladas. Desse volume, 83% foram de leite de vaca, 14% de búfala, 2% de cabra, 1% de ovelha e de camela menos de 1% do total. Nesses cálculos foram considerados 199 países com leite de vaca, enquanto em 25 deles a produção veio também de búfalas (EMBRAPA, 2018).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, com 35,1 bilhões de litros/ano. Em 2016, o volume captado para processamento em indústrias de laticínios do país foi de 23 bilhões de litros; em 2017, subiu para 24,3 bilhões (EMBRAPA, 2018).

O estado líder na produção de leite é Minas Gerais, com quase 9 bilhões de litros por ano, 27% do total nacional, seguido por Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. O estado de Goiás, que chegou a produzir 3,8 bilhões de litros, reduziu o volume em 843 milhões de litros, chegando a 2,9 bilhões em 2016 e no ano passado a estimados 2,599 bilhões de litros. No Nordeste, os estados que mais produziram foram Pernambuco, Ceará e Bahia, que em 2014, alcançou um volume de 1,2 bilhão de litros (EMBRAPA, 2018).

##### **3.1.2. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite**

Um dos requerimentos atuais da sociedade é a disponibilidade de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos e com base nestes princípios o *Codex Alimentarius* surge como um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), criado em 1963, com o objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos incluindo padrões, diretrizes e guias sobre Boas Práticas e de Avaliação de Segurança e Eficácia.

Muitos são os países que adotam as normas internacionais presentes no *Codex Alimentarius* como referência para a legislação nacional, estabelecendo assim

critérios de qualidade que atenda o mercado consumidor interno e o mercado internacional.

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) com a estruturação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), juntamente com o Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), tem resguardado as condições correlacionadas a segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e derivados através de implementações de regulamentos, normativas e fiscalização dos estabelecimentos que realizam o processamento e comercialização.

### **3.1.3. Boas Práticas Agropecuária na produção Leiteira**

A adoção de procedimentos adequados em todas as etapas da produção de leite nas propriedades rurais é conhecida como Boas Práticas na Pecuária Leiteira. Essas práticas servem para que o leite e os seus derivados sejam seguros e de qualidade aos consumidores.

As ações dessas boas práticas englobam os princípios de sanidade animal, higiene na ordenha, nutrição, bem-estar animal, meio ambiente e gestão socioeconômica.

Dentro do contexto de sanidade animal a inflamação da glândula mamária (mastite), está entre as diversas patologias que mais afeta o rebanho leiteiro. Esta enfermidade se destaca por causar grandes prejuízos econômicos associados ao descarte do leite, a queda da produção leiteira, os gastos com antibióticos e, eventualmente, o descarte do animal (SMITH, 2006).

### **3.1.4. Mastite**

A mastite é a inflamação da glândula mamária que se caracteriza por apresentar alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite. As mais comumente observadas são: alteração de coloração, aparecimento de coágulos e presença de grande número de leucócitos. (RADOSTITS, 2000).

Sua origem pode ser infecciosa, tóxica, traumática alérgica ou metabólica, sendo as causas infecciosas as principais e primárias, e as outras causas



secundárias, destacando-se as bactérias pela maior frequência, além de fungos, algas e vírus (RADOSTITS, 2000).

A mastite é classificada de acordo com a manifestação dos sinais clínicos, podendo ser uma mastite clínica, a qual é facilmente detectada, o úbere apresenta-se edemaciado, aumento de temperatura, vermelhidão, dor a palpação e ao realizar o teste da caneca de fundo preto observa-se presença de grumos, podendo ainda apresentar pus e sangramento. Animais acometidos podem ficar debilitados e ir a óbito (SMITH, 2006).

A mastite subclínica, manifesta de forma silenciosa, não sendo visíveis alterações macroscópicas, para avaliar a presença da inflamação subclínica é necessário o uso de testes indicadores como o *California Mastitis Test* (CMT) ou a Contagem de Células Somáticas (CCS), que indicam a quantidade das células inflamatórias no leite (ANDRADE, 2012).

De acordo com Santos & Fonseca (2007), as infecções causadas por *S.aureus* apresentam-se, geralmente, na forma subclínica e pode haver um aumento variável da contagem de células somáticas (CCS).

Atualmente a CCS tem sido um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a qualidade do leite no Brasil e em várias partes do mundo, pois serve como forma indireta de diagnosticar a ocorrência desta doença entre os rebanhos bovinos leiteiros (GARCIA, 1996).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018, estabelece um limite máximo de 500.000 CS/mL quinhentas mil células somáticas por mililitro de leite em tanques de expansão (BRASIL, 2018).

Diante da implementação da IN77 na melhoria da qualidade do leite o monitoramento e o tratamento adequado da mastite devem ser direcionados a fim de evitar a disseminação da enfermidade e a possibilidade de resíduos de antibiótico no leite, terapias alternativas como a ozonioterapia vem surgindo como alternativa de tratamento evitando desta forma as perdas econômicas e risco a saúde pública.

## **3.2. Staphylococcus aureus**

### **3.2.1. Características**

Os *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados.

Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (CASSETTARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2005; TRABULSI et al., 2005).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse na área da medicina veterinária e saúde pública é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções e perdas econômicas (CASSETTARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2005).

Em ambientes úmidos, podem ser encontradas entre  $10^3$  a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>. A maioria tem uma necessidade nutricional relativamente complexa, mas em geral, requerem uma fonte orgânica de nitrogênio, que pode ser fornecido por cinco a 12 aminoácidos essenciais como arginina, valina e vitaminas do complexo B (JAY, 2005).

Ainda, podem crescer num intervalo de pH entre 4,8 e 9,4, resistir a ambientes secos e altas temperaturas como 60°C por até 30 minutos. As colônias da espécie *S. aureus* são β-hemolíticas devido à produção de várias hemolisinas como a α-toxina e a β-toxina. Também são resistentes, devido a produção de osmoprotetores, a meios com concentrações de NaCl entre 7,5% e 10% (SOMMERVILLE, 2009).

### **3.2.2. Fatores de virulência**

O agente etiológico *Staphylococcus aureus* da glândula mamária de bovinos variam de não-patogênicos a altamente patogênicos. Hemólise e produção de coagulase em cultura são guias úteis para a determinação da patogenicidade. Os produtos extracelulares liberados durante o crescimento estafilocócico e a capacidade do microrganismo em se aderir às superfícies epiteliais são importantes fatores de virulência (SMITH, 2006).

### **3.2.3. Interação *Staphylococcus aureus* e glândula mamária**

O reservatório principal de *S. aureus* nos rebanhos é o epitélio dos tetos e úberes. Os animais infectados espalham as bactérias no leite em concentrações que variam,

geralmente, entre  $10^2$  e  $10^5$  unidades formadoras de colônia por mililitro (PETON & LE LOIR, 2013).

Em estudo realizado por Nagase et al. (2001) foi coletada amostras da superfície da pele de vacas, verificando a presença de *S. aureus* em 23,3% das amostras, mostrando que a espécie é habitante natural de epitélio de bovinos, além de alguns outros animais de sangue quente em quantidades variáveis. O microrganismo pode ser veiculado por transmissão cruzada entre úberes durante a ordenha através do equipamento a vácuo ou pelas mãos do ordenhador, segundo trabalho realizado por Sakwinska et al. (2011).

A mastite causada por *S.aureus* é uma infecção de longa duração, com tendência a cronificação e baixa taxa de cura, tanto espontânea como por uso de antibióticos (SANTOS & FONSECA, 2007). Tal característica infecciosa ocorre porque o *S.aureus* possui grande capacidade de invasão, o que permite sua instalação em partes profundas da glândula mamária, além disso, há formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando “bolsões” de bactérias que impedem o acesso dos antibióticos ao local da infecção (SANTOS & FONSECA, 2007).

#### **3.2.4. Importância na saúde pública**

O *Staphylococcus aureus* é frequentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis assim como podem estar presentes em ambientes e alimentos contaminados por higiene inadequada. As manifestações clínicas causadas pelo *S.aureus* em humanos podem ser divididas em três tipos: infecções superficiais, como abscessos cutâneos; infecções sistêmicas, como bacteremia e endocardite; intoxicações como a síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (TRABULSI et al., 2008).

A severidade da doença depende da quantidade de alimento ingerido, da quantidade da toxina e do estado geral da saúde do acometido. A quantidade de toxina necessária para provocar intoxicação varia entre 20 e 100 ng e a doença só ocorre caso haja ingestão da toxina pré-formada no alimento, pois a bactéria, quando ingerida, não produz a toxina. Os sintomas incluem vômitos, diarreia, dor abdominal e náuseas (SCHELIN et al., 2011; MURRAY, 2010).

O período de incubação varia entre 30 minutos até 8 horas, é uma doença autolimitante, raramente letal e os idosos são mais susceptíveis (SANTANA, 2006; PINCHUK et al., 2010).

No Brasil, são poucos os registros das ocorrências de surtos relacionados às doenças transmitidas por alimentos. No entanto, as intoxicações estafilocócicas são muito comuns no país, sendo a maioria dos casos não investigada ou não notificada (PEREIRA et al., 1994). No período de 2000 a 2015, *S. aureus* foi diagnosticado como agente causal de 7,7% dos surtos intoxicação alimentar ocorridos no Brasil (BRASIL, 2015).

Em 1998 no Brasil, ocorreu um surto de intoxicação alimentar, em uma família que ingeriu queijo contaminado onde foi identificado um nível de contaminação para o *S.aureus* superior a  $10^6$  UFC/g (SABIONI et al., 1998).

### **3.2.5. Ocorrência no leite**

A prática da comercialização do leite *in natura* no Brasil, apesar de proibida pela legislação é uma prática regular e que expõe os consumidores a riscos microbiológicos. Diversos trabalhos têm constatado a presença de microrganismos patogênicos no leite proveniente da venda informal, dentre os quais destaca-se o *S. aureus*.

Souza et al., (2011) constatou que 80% das amostras coletadas do leite proveniente da venda informal na cidade de Areia- Pernambuco, apresentaram *Staphylococcus sp.* onde 30% destas correspondem a *S.aureus*. Maciel et al., (2008) verificou na cidade de Itapetinga –Bahia a variação da contagem de *S. aureus* de  $2,5 \times 10^2$  a  $2 \times 10^6$  UFC/mL, no leite cru proveniente de venda informal.

## **3.3. Ozônio**

### **3.3.1. Histórico**

Christian Friedrich Schönbein, foi o primeiro a reconhecer o ozônio como uma substância química, considerado o pai da ozonioterapia. No ano de 1840 ele observou que quando a água era submetida a uma descarga elétrica, era produzido um cheiro estranho, que ele denominou de “ozon”, que significa odor em grego (PENIDO et al., 2010).

A fórmula química do ozônio  $O_3$ , foi então estabelecida por Jacques Louis Soret, que propôs se tratar de uma molécula composta por 3 átomos de oxigênio, uma modificação alotrópica do oxigênio (SORET, 1865).

Após ser identificado cientificamente como um composto, e por sua capacidade germicida, o primeiro aparelho gerador de ozônio foi construído e patenteado por Nikola Tesla em 1896, que 4 anos depois fundou a primeira companhia, a “Tesla Ozone Company”, com o propósito de uso medicinal do ozônio (MANDHARE et al.,2012), e em 1898 em Berlin na Alemanha, o Instituto para Ozonioterapia começou pela primeira vez a aplicar ozônio em animais.

Em 1936, o ozônio já era utilizado no tratamento de água potável por toda Europa. Atualmente é amplamente usado na indústria alimentícia, área médica, e afins.

### 3.3.2. Propriedades

Na natureza, o ozônio é produzido continuamente na estratosfera (25 a 30 km da superfície terrestre) pela radiação ultravioleta (<83 nm), que quebra as moléculas de oxigênio em dois átomos altamente reativos. Através de uma reação endotérmica, cada um destes átomos se liga ao oxigênio intacto (O<sub>2</sub>) para formar molécula de ozônio (O<sub>3</sub>). Pode, ainda, ser produzido durante a descarga elétrica dos raios, que catalizam a formação do ozônio a partir do oxigênio atmosférico (PIRANI, 2011).

O ozônio é um gás que possui odor característico sendo fácil de ser identificado, altamente reativo e instável, rapidamente se decompõe e se torna oxigênio, sofrendo influência direta pela temperatura e pressão, características que fazem com que o mesmo não possa ser transportado nem armazenado, devendo então ser gerado “*in situ*” e utilizado logo em seguida (NAKAJIMA, et al., 2011; STRENG, 1961).

O ozônio possui um grande poder oxidativo (2,07mV), perdendo apenas para o flúor (3,06mV) (SILVA, 2011). (Tabela 1)

**Tabela 1.** Comparativo do poder oxidativo do ozônio.

<b>Agente oxidante</b>	<b>Potencial de oxidação (mV)</b>
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,5
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Adaptado de Guzel-Seydim et al., 2004.

É também uma molécula que apresenta ação fungicida, viricida e bactericida (SUNNEN, 2001), características que permitiu sua ampla utilização na sanitização de diversos materiais, tratamento de água, piscinas, efluentes, além da vasta aplicabilidade na área médica em diversas enfermidades.

### **3.3.3. Produção do Ozônio**

O ozônio é gerado a partir da separação de uma molécula diatômica de oxigênio, em que esse oxigênio livre reage com outra molécula diatômica e forma assim a molécula triatômica de oxigênio. Para que ocorra essa reação é necessária uma grande energia, uma reação por tanto endotérmica, a qual é descrita da seguinte forma:  $3O_2 \leftrightarrow 2O_3 \Delta H = + 284,5 \text{ kJ/mol}$  (SILVA et al., 2011).

Os principais métodos para realizar essa reação são a radiação ultravioleta, método fotoquímico, e através de uma descarga elétrica pelo processo corona, sendo este o método mais eficiente com produção instantânea do ozônio e a adotada pelos equipamentos geradores de ozônio comerciais atuais (COUTO, 2014).

A formação do ozônio para fins terapêuticos pode se dar por diferentes métodos, onde se faz uso do oxigênio medicinal puro, passando-o por um gradiente de alta voltagem (5-13 Megavolts) resultando em uma mistura gasosa com 95% de oxigênio e 5% ozônio. O qual para ter efeito terapêutico desejado deve ser prescrito por um tempo determinado e na concentração adequada. (ZANARDI, 2016).

Por ser um gás instável, se decompondo rapidamente em oxigênio, sendo este um fator limitante ao seu armazenamento e transporte (ZANARDI, 2016) possui meia vida de 40 minutos a 20°C (BOCCI, 2006), devendo então ser produzido próximo a sua aplicação através de geradores de ozônio medicinal portáteis.

### **3.3.4. Mecanismo de ação nas bactérias**

O poder de inativação das bactérias pelo ozônio se dá tanto pela ação do ozônio molecular sob o envoltório bacteriano como pelos radicais livres produzidos na decomposição do mesmo, como a hidroxila, superóxido e hidro peróxido, que agindo sobre os ácidos graxos insaturados, glicoproteínas, glicolípideos e enzimas da parede celular bacteriana, e nos ácidos nucleicos intracelulares das mesmas, provocam

alterações no funcionamento e ruptura da membrana, levando a morte celular rapidamente (COUTO, 2014).

O envoltório das bactérias gram positivas como o *Staphylococcus aureus* é constituído por três camadas, o ozônio quando em contato com a membrana rica em glicopeptídeos é capaz de desfazer a integridade desse envelope através da peroxidase desses fosfolípidos e glicoproteínas (SUNNEN, 2001).

### **3.3.5. Aplicação em Vacas**

Diversas aplicações do ozônio na buiatria são descritas na literatura com resultados satisfatórios, Scrolavezza et al (1997) relatou tratamento com ozonioterapia em mais de cinco mil vacas leiteiras com mastite clínica, utilizando diferentes protocolos de aplicação do gás, também aplicou em casos de metrites, endometrite e piometra, Burton (2000) também teve resultado efetivo no tratamento da mastite clínica e subclínica, seus resultados corroboram com os de Ogata; Nagahata (2000).

Burton (2000) ainda sugere protocolo de infusão intramamária do ozônio a ser utilizado nas vacas com mastite, com aplicações numa concentração de 30 a 120mcg/l de ozônio e repetida por 6 vezes a cada 10 minutos. Já Scrolavezza et al., (1997) realizou aplicação intramamária com volume de 50 a 100ml em diferentes concentrações a depender do grau de severidade e o tipo de mastite, Ogata; Nagahata (2000) descreveram o uso de 1 a 2 litros de ozônio na concentração de 6 miligramas/L. Demonstrando ausência de um protocolo fixo de tratamento com ozônio nas vacas com mastite Por tanto neste experimento foi escolhido um protocolo de aplicação intramamária baseado na vivência a campo atual de colegas atuantes na área, a fim de comprovar que a concentração e volume utilizado é eficaz. Optando-se por utilizar a concentração de 44mcg/mL em um volume de 60 mL por teto em aplicações diárias por 5 dias consecutivos.

Nenhum pesquisador relatou efeito adverso nas vacas que receberam ozonioterapia, como irritação, necrose, edema ou algum sinal inflamatório provocado pela aplicação do gás, mesmo em altas concentrações (Ogata e Nagahata, 2000), o mesmo pôde ser observado neste experimento

O ozônio vem se destacando principalmente por ausência de resíduos tóxicos após a aplicação, não requer período de carência podendo o leite ser utilizado pela

indústria sem alterações, não representando riscos à saúde pública e mostrando ser uma alternativa viável às terapias convencionais com antibióticos. (PEREIRA, 2003).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado em 3 propriedades rurais localizadas no sul da Bahia, Brasil, na qual 2 propriedades são especializadas na produção leiteira de vacas bovinas e uma propriedade na produção leiteira bubalina, a pesquisa foi executada seguindo princípios éticos da experimentação animal submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA), protocolo de número 008/17 da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Teve como período experimental 31 dias distribuídos entre os meses de outubro a dezembro de 2018 nas propriedades de vacas bovinas e nos meses de fevereiro a março de 2018 nas vacas bubalinas.

##### **4.1.1. Obtenção das amostras de leite Propriedade A**

##### **4.1.2. Características da propriedade rural e do rebanho**

Propriedade que fica localizada no Sul da Bahia, sendo produtora de leite bovino. Possui rebanho constituído de 47 vacas da raça Girolando. Foram utilizadas 16 vacas totalizando 30 quartos mamário positivos para mastite.

A ordenha nesta propriedade era realizada de forma manual com balde e bezerro ao pé, uma vez ao dia por 3 colaboradores da fazenda. Não era implementado o uso de pré e pós *dipping* nem de higienização das mãos dos ordenadores, apenas limpeza dos baldes com água morna. Após serem ordenhadas cada vaca era encaminhada a um curral de espera junto com seu bezerro e ao final da ordenha de todas, as vacas eram então separadas do bezerro e soltas no piquete. Possuía tanque de expansão para armazenamento do leite na propriedade. Os animais eram mantidos em regime de pastoreio rotativo racional com capim do gênero *Brachiaria spp.*, havia fornecimento de sal mineral em cocho e suplementação com concentrado de soja e milho no momento da ordenha, sendo de cerca de 2kg por vaca. A produção média diária de leite das vacas de 8,5 litros.



### **4.1.3. Propriedade B**

#### **4.1.3.1. Características da propriedade rural e do rebanho**

Propriedade localizada na região Sul da Bahia, possui 58 vacas bovinas leiteiras da raça Girolando, na qual 6 vacas apresentaram-se com 6 quartos mamários positivos para mastite subclínica. A ordenha era assessorada por apenas um funcionário, realizada duas vezes ao dia de forma mecânica, em sistema de circuito fechado direto para o tanque de expansão. Com bezerro ao pé somente durante a ordenha e logo após eram separados. As vacas após ordenha eram imediatamente encaminhadas ao piquete para se alimentarem. Não era implementado o uso de pré e pós *dipping* nem de higienização das mãos do ordenador, apenas limpeza da ordenhadeira e tubulações com uso de detergentes apropriados. Animais mantidos em regime de pastoreio rotativo racional com capim do gênero *Brachiaria spp.*, fornecimento de sal mineral em cocho e suplementação com concentrado de soja e milho no momento da ordenha, sendo cerca de 3kg por vaca. A produção média diária de leite das vacas de 11,5 litros.

### **4.1.4. Propriedade C**

#### **4.1.4.1. Características da propriedade rural e do rebanho**

Propriedade localizada no Sul da Bahia, produtora de leite bubalino para beneficiamento próprio, com rebanho total em lactação de 63 búfalas da raça Murrah, divididas em 2 lotes de ordenha, apresentando 17 vacas positivas para mastite subclínica com 27 quartos mamários afetados. A ordenha era realizada por três funcionários de forma manual, com bezerro ao pé, após ordenha as vacas aguardavam no curral de espera até que todo lote fosse ordenhado e assim eram soltas junto com seus bezerros, os quais permaneciam até o período da tarde quando eram levados ao curral de ordenha. Não realizavam pré e pós *dipping*, nem a higienização das mãos dos ordenadores, apenas limpeza dos baldes com detergente próprio. Animais criados em sistema de pastoreio rotativo racional com capim do gênero *Brachiaria spp.* e fornecimento de sal mineral em cocho sem suplementação. Com produção média diária de 5,7 litros de leite.

## 4.2. Seleção Animais

As vacas bovinas e bubalinas do experimento foram selecionadas durante o período de lactação e submetidas a avaliação para mastite clínica e subclínica. Para a mastite clínica foi realizada o teste da caneca de fundo preto, no qual se dá através da observação de alterações no aspecto e coloração do leite, classificando quanto à severidade da doença (fraca, moderada ou severa), avaliando também os sinais de inflamação local da glândula mamária. Para a mastite subclínica as vacas foram submetidas ao teste *California Mastitis Test* (CMT) que estima a quantidade de células somáticas no leite, observando a reação do leite ao reagente seguindo a metodologia de SCHALM & NOORLANDER (1957), no qual após antisepsia do teto é desprezado os primeiros jatos de leite, e uma amostra de 2 mL é colhida em bandeja apropriada, e adicionado a mesma quantidade do reagente, realiza-se a homogeneização em movimentos circulares, durante 10 segundos, para se fazer a leitura e a interpretação da prova em seguida. Foram consideradas positivas as amostras que apresentavam evidente formação de gel viscoso, e negativas as misturas que permaneceram inalteradas, sem a clara evidenciação de viscosidade.

Foram desconsideradas as vacas que apresentarem reações positivas ao CMT nos primeiros 10 dias de lactação e nos 30 dias anteriores a secagem.

Foram incluídas no experimento apenas vacas confirmadas para mastite subclínica. No total foram selecionadas 36 quartos mamários de vacas bovinas e 27 quartos de vacas bubalinas aptas a participarem do experimento por serem positivas no CMT, as quais foram devidamente identificadas pelo nome, numeração do brinco e o quarto mamário afetado, procedendo-se então a colheita da amostra de leite de cada quarto.



**Figura 1.** *California Mastitis Test* demonstrando 3 quartos negativos (sem formação de grumos) e 1 quarto positivo (com formação de grumos).

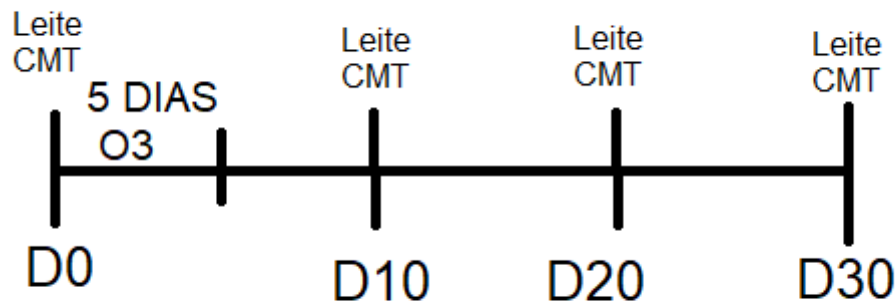
Fonte: Arquivo pessoal.

#### **4.3. Aplicação "in vivo" do ozônio**

O equipamento utilizado para produção do gás foi um gerador analógico portátil de ozônio (Ozonic vet ®, Ozonic), o qual gera ozônio por descarga elétrica (efeito "CORONA") de alta voltagem, através do uso de oxigênio medicinal, com grau de pureza de 99%, acompanhado por um cilindro de oxigênio portátil e um regulador de fluxo de oxigênio.

A aplicação do gás foi realizada após esgotamento total do leite, somente nos tetos acometidos, depois da antissepsia do óstio com gaze estéril embebido em álcool etílico 70%, procedeu-se a infusão intramamária com auxílio de uma sonda uretral nº 6 acoplada numa seringa contendo 60 mL do gás numa concentração de 44mcg/L.

O período experimental foi de 31 dias. Foram realizados o teste de CMT e a coleta da amostra de leite correspondente ao dia 0 (D0). Do dia um ao dia cinco foram realizadas diariamente uma aplicação do gás. Após este período, as vacas foram apenas monitoradas a cada dez dias com teste de CMT e coleta de leite, totalizando três monitoramentos; os quais são denominados dia10 (D10), dia 20 (D20), e dia 30 (D30) após a ozonioterapia. Como esquematizado na ilustração abaixo:



**Figura 2.** Demonstração do período experimental e monitoramento após aplicação do ozônio nas vacas e búfalas.

As vacas identificadas com mastite subclínica e positivas para *Staphylococcus aureus* receberam tratamento com ozônio, totalizando 144 observações, monitoradas em 4 tempos distintos (D0, D10, D20 e D30), divididos por cada quarto mamário (AD, AE, PD e PE).

As búfalas tratadas com ozonioterapia totalizaram 29 tetos, representando 116 observações, em 4 tempos observacionais (D0, D10, D20 e D30), divididos por cada quarto mamário (AD, AE, PD e PE).

#### **4.4. Colheita e envio das amostras**

As amostras de leite D0, D10, D20, e D30 foram coletadas após antissepsia do óstio papilar dos tetos das vacas com gaze estéril e álcool etílico 70%, amostras foram colhidas individualmente de cada quarto mamários positivo no *California Mastitis Test* (CMT), foram então coletados assepticamente aproximadamente 5 mL de leite, em tubos com tampa rosqueável, estéreis previamente identificados com o nome ou número do animal e do quarto mamário proveniente, acondicionados em caixa térmica contendo gelo reciclável. As amostras do leite foram encaminhadas e processadas nas dependências do Laboratório de Microbiologia Veterinária, no hospital veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizada em Ilhéus-BA.

#### **4.5. Isolamento e identificação das estirpes de *Staphylococcus aureus*.**

Para o isolamento realizou-se a inoculação de 10µL de leite com auxílio de uma alça de platina em 5mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), em seguida as amostras

foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após este período, dos caldos que turvaram foi retirada uma alíquota de 5µL com auxílio de uma alça de platina para realização da técnica de esgotamento em placa de petri contendo ágar *Baird-Paker* que foi incubada à 37°C durante 24 a 48 horas.

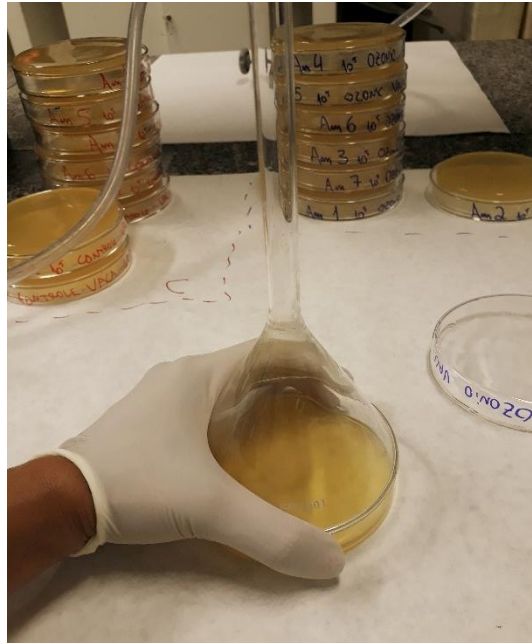
Após a incubação, colônias sugestivas de microrganismos do gênero *Staphylococcus spp.* foram submetidas à coloração pelo método de Gram. As colônias classificadas como cocos gram-positivos foram submetidas às provas da catalase, realizada utilizando fração de uma colônia de *Staphylococcus spp.*; em uma gota de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%, as estirpes que apresentaram formação de bolhas (liberação de gás) foram consideradas catalase positivas. Os cultivos bacteriológicos ainda foram submetidos ao teste de coagulase lenta utilizando plasma de coelho e verificação da formação ou não de coágulos até no máximo 24 horas.

As estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas à prova para verificação da produção de acetoina (caldo MRVP - Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius*. As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose (MAC FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*. As estirpes que se mostraram positivas a essas provas foram então classificadas como *Staphylococcus aureus* (HOLT et al., 1994).

#### **4.6. Aplicação "In Vitro" do ozônio nas amostras positivas para *S. aureus***

Após identificação das estirpes de *Staphylococcus aureus* a colônia isolada de cada amostra foi transferida para um tubo contendo 5mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), em seguida foi incubada à 37°C por 24 horas. Após crescimento foi realizada a diluição seriada, onde 1mL do cultivo foi colocado em 9 mL de NaCl estéril para a primeira diluição 10<sup>1</sup>, desta primeira diluição seguiu-se o mesmo procedimento para preparar a diluição 10<sup>2</sup> e assim por diante até chegar a 10<sup>15</sup>, desta última diluição foi retirada 1mL para ser espalhada com auxílio da alça de drigalski em duas placas de petri contendo ágar *Baird-Paker*, uma das placas foi imediatamente submetida a infusão do gás ozônio, utilizando um funil de vidro acoplada a placa e conectado ao aparelho gerador do gás por uma mangueira de silicone, numa concentração de 44mcg/L, durante 5 minutos no fluxo médio, conforme ilustrada na figura 3. A outra

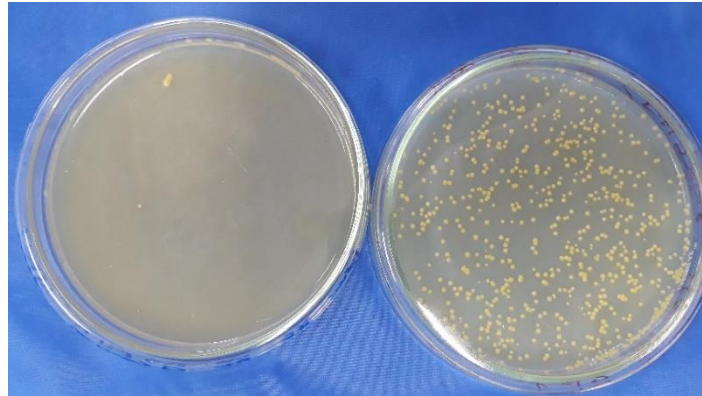
placa não foi submetida a infusão do gás, considerada então como controle. As duas placas, controle e ozonizada, foram incubadas à 37°C durante 24 horas para posterior contagem de células viáveis representada em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).



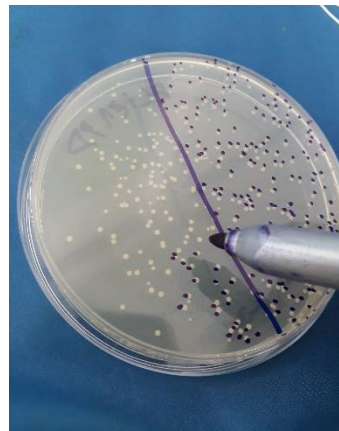
**Figura 3.** Aplicação do ozônio em placa.  
Fonte: Arquivo pessoal.

#### **4.7. Contagem de unidades formadoras de colônia após aplicação do ozônio “in vivo”**

Após a aplicação de ozônio nas vacas, foram realizadas as coletas do leite em períodos determinados já descritos. De cada amostra do leite realizou-se a inoculação de 10µL com auxílio de uma alça de platina em 5mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), em seguida as amostras foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após crescimento foi realizada a diluição seriada, onde 1ml do cultivo foi colocado em 9 mL de NaCl estéril para a primeira diluição  $10^1$ , desta primeira diluição seguiu-se o mesmo procedimento para preparar a diluição  $10^2$  e assim por diante até chegar a  $10^{15}$  desta última diluição era retirada 1mL para ser espalhada com auxílio da alça de drigalski em placa de petri contendo ágar *Baird-Paker*, sequencialmente a placa era incubada à 37°C durante 24 horas (figura 4) para posterior contagem bacteriana total (figura 5), representada em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Este mesmo processo foi aplicado a todas as amostras do dia 0, dia 10, dia 20, e dia 30 após aplicação do ozônio.



**Figura 4.** Placa ozonizada a esquerda e placa controle a direita.  
Fonte Arquivo pessoal.



**Figura 5.** Contagem de Unidade Formadora de Colônia.  
Fonte: Arquivo Pessoal.

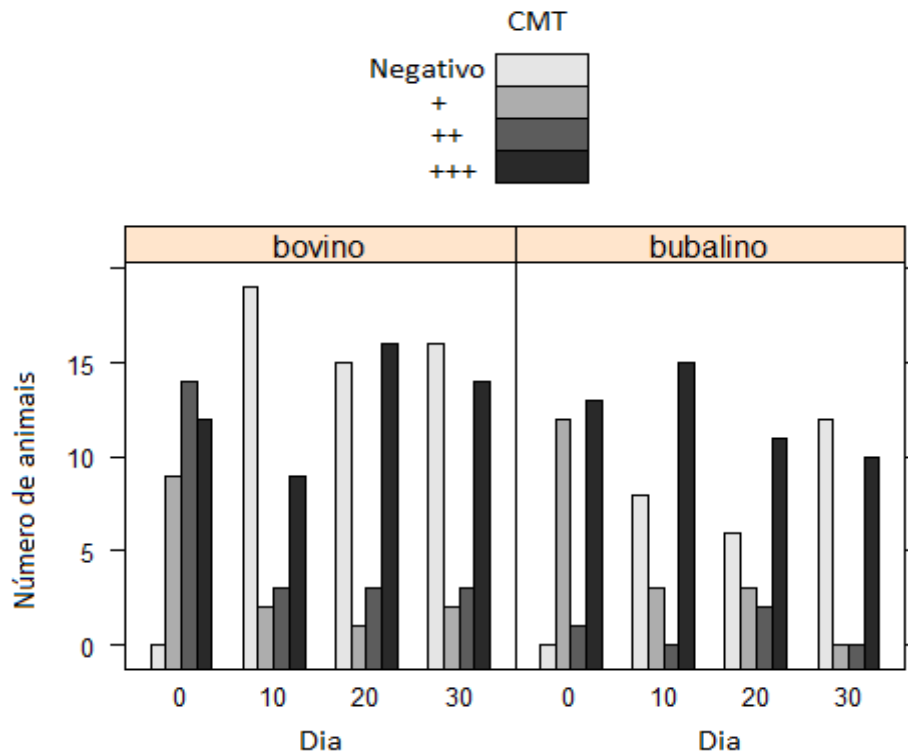
#### 4.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico R (Ross Ihaka, Robert Gentleman, 1993). Foi verificada a normalidade dos resíduos, e a homogeneidade das variâncias. As UFCs “*in vitro*” de isolados *S. aureus* do leite vacas e búfalas com mastite foram avaliadas por análise de regressão, por meio de polinômios ortogonais. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*, utilizando  $p < 0,05$  como referência para valores significativos. Além disso foram realizados análise de distribuição de frequência residual e prevalência.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CMT em vacas e Búfalas “in vivo”

Os dados de CMT foram analisados em conjunto com o dia e tetos em relação a contagem de UFC para *S. aureus*, tanto em vacas das duas propriedades quanto nas búfalas (figura 6).



**Figura 6.** Distribuição do resultado do monitoramento pelo teste CMT de vacas e búfalas.

Entretanto os resultados encontrados não foram significativos  $p > 0,05$ . Acredita-se que esse resultado ocorreu pela sensibilidade maior deste teste. Como descrito por Sargeant (2001), em que a sensibilidade de detectar infecções intramamária com algum patógeno foi de 56,7%, com muitos patógenos de 66,7%, com poucos patógenos de 49,5%. Por tanto diferenças pequenas, em que nesse estudo o número amostral limitado não permitiu encontrarmos maiores diferenças entre as amostras.

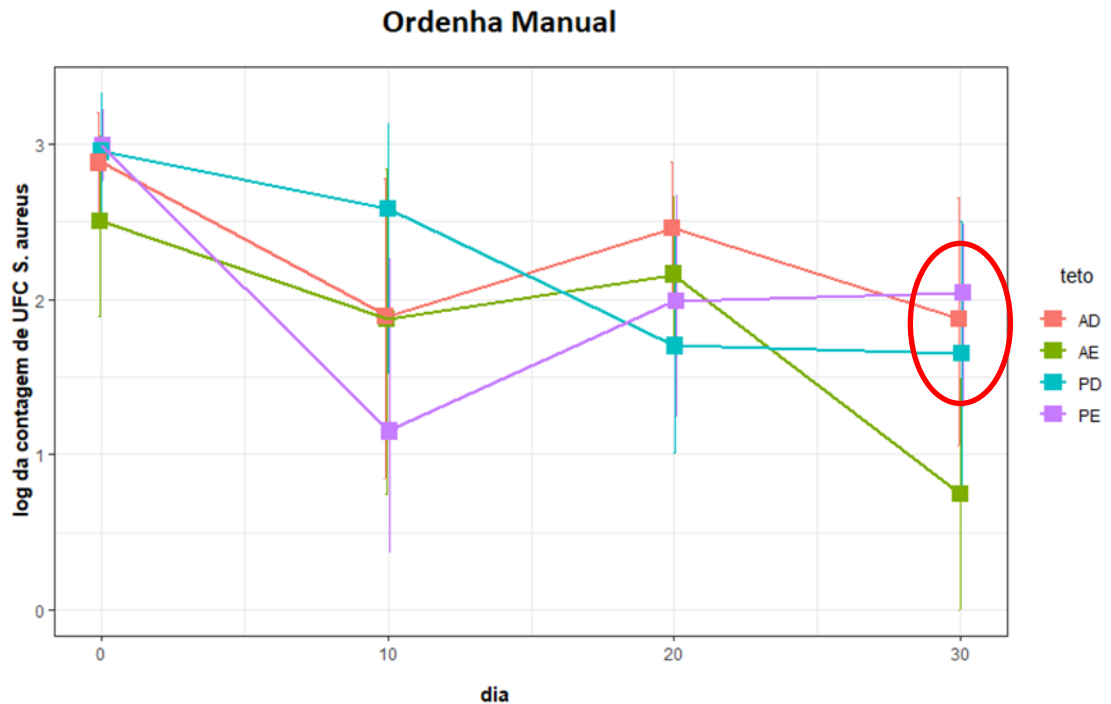
Há também a possibilidade do ozônio através do estímulo ao sistema de defesa, provoque um influxo de leucócitos, como relatado por Pereira et al., (2003), provocando presença de coágulos no leite que podem levar a um resultado falso positivo no teste CMT, sendo este considerado um teste de triagem devendo ser



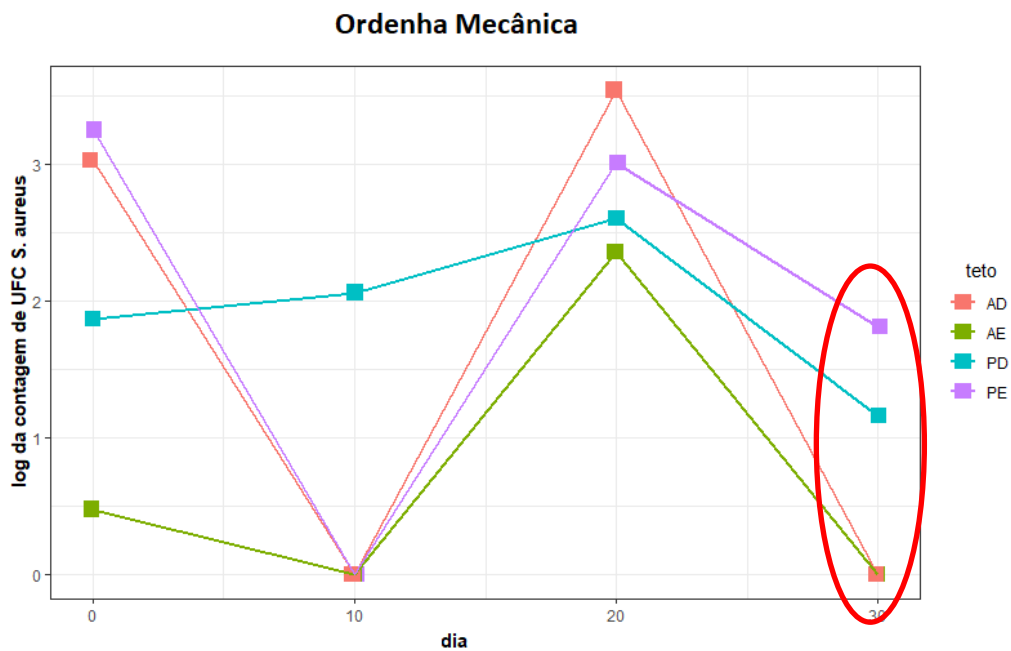
acompanhado pelo teste microbiológico para confirmar a presença ou não do agente infeccioso (MELO, 2011).

### 5.2. Vacas “*in vivo*”

As propriedades rurais de vacas bovinas do experimento apresentam diferentes tipos de ordenha, a mecânica e manual, sendo este um fator a ser considerada quanto ação do ozônio na análise dos dados, devido aos diferentes desafios a que estão submetidas pela diferença de tecnologia. A seguir, o gráfico demonstra a diferença entre a contagem de UFC de *S. aureus* entre os dias 0, 10, 20 e 30 (representada em logs) de cada teto nos diferentes tipos de ordenhas (figura 7 e 8).



**Figura 7.** Variação da contagem de UFC por teto na propriedade de ordenha manual nos diferentes tempos de observação.



**Figura 8.** Variação da contagem de UFC por teto na propriedade de ordenha mecânica nos diferentes tempos de observação.

Nota-se que nas duas propriedades houve redução do UFC no período observacional D30 quando comparado com o inicial independentemente do tipo de ordenha utilizado. Destaca-se também a variabilidade de contagem ao longo dos tempos observacionais. No qual podemos avaliar após quanto tempo da aplicação do gás ozônio tivemos uma melhor resposta com a diminuição do UFC, podendo inferir uma sugestão de reaplicação do ozônio nesses períodos para se evitar uma reinfecção e assim um maior controle dos microorganismos. Na propriedade que possui manejo de ordenha mecânica no dia 10 houve uma melhor resposta das vacas à ozonioterapia, quando comparada a propriedade com ordenha manual. Já no dia 20 ocorreu o oposto, houve um grande aumento na contagem de UFC da ordenha mecânica. A resposta global ao ozônio na propriedade de ordenha mecânica foi relativamente melhor quando comparada a de ordenha manual. Isso se deve ao desafio na propriedade de ordenha manual se mostrar ser alta, como o maior contato entre as mãos de ordenhadores e os tetos das vacas, Melo (2011), encontrou uma prevalência de 8,9% de *S. aureus* nas mãos dos ordenhadores, sendo uma fonte de infecção a ser considerada. Além da quantidade de ordenhadores ser maior também, outro fator importante a ser considerado é que as vacas nesse tipo de ordenha após serem ordenhadas permaneciam no curral de espera e assim estão sujeitas a intensa contaminação dos tetos e úbere, pois podem se deitar em ambiente com elevada

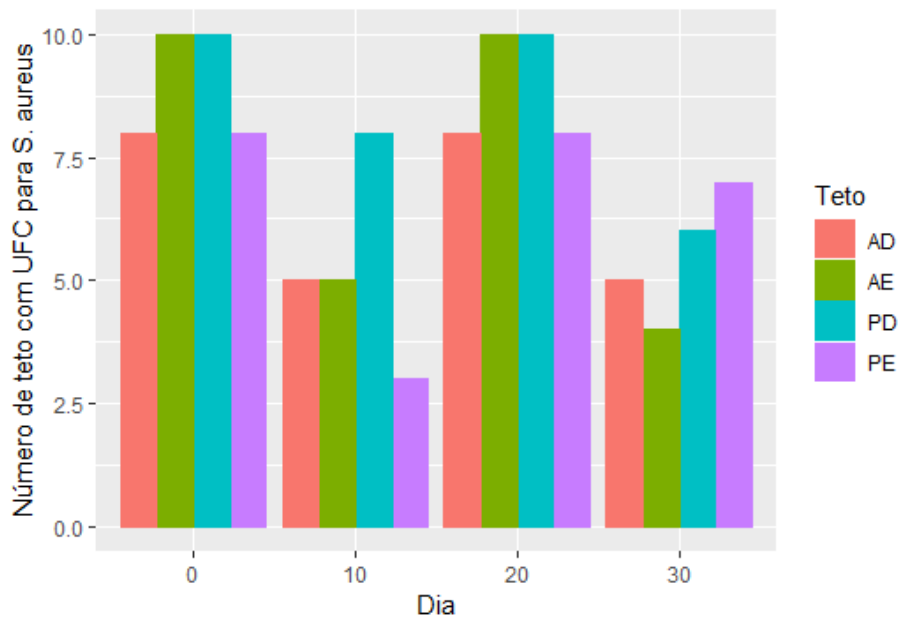
carga microbiana, atingindo contagem bacteriana de 10<sup>8</sup> a 10<sup>10</sup> UFC/mL (BRAMLEY, 1982), o que não ocorria na propriedade de ordenha mecânica em que as vacas eram imediatamente soltas para o piquete e iniciavam o pastejo, permanecendo em estação e evitando novas infecções..

Sakwinska et al. (2011) afirma que a mastite pode ser transmitida pelo equipamento da ordenhadeira mecânica e pelas mãos do ordenhador. Apesar das fontes de infecção serem altas na propriedade de ordenha mecânica, com todo o aparato de tubulação, insufladores, mangueiras, borrachas, teteiras e outros que a compõem, a higienização e manutenção destes parece ser efetiva na propriedade, pois houve uma boa resposta ao tratamento e a reinfecção das vacas foi baixa quando comparada a ordenha manual da outra propriedade. Visto que Melo encontrou no ambiente de ordenha uma frequência de isolamento de *S. aureus* nos insufladores com 59,7%, seguido das mangueiras com 16,9% enquanto nas mãos dos ordenhadores apenas 8,9%. Contrariando também o encontrado por Guerreiro (2005), quando comparou os dois tipos de ordenha e notou que a propriedade com ordenha manual teve índices inferiores de contaminação quando comparado a de ordenha mecânica.

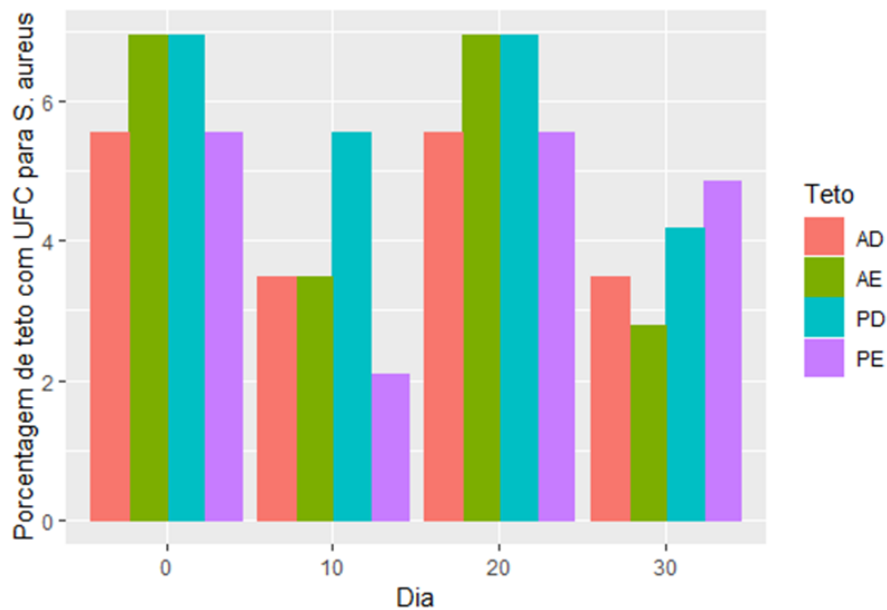
O rebanho das propriedades A (manual) e B (mecânica) do experimento apresentaram prevalência de mastite subclínica por *S.aureus* de 34,04% e 10,34% respectivamente, esses valores são altos, no qual MARTINS et al. (2010) encontrou em condições semelhantes uma prevalência de 21,5% e possivelmente ocorre devido falta de *pré-dipping* e *pós dipping* que poderiam reduzir a contaminação da extremidade dos tetos bem como o risco de novas infeções (GUERREIRO, 2005).

Nas duas propriedades o bezerro realiza a mamada antes da ordenha, o que contribui para um aumento significativo da quantidade de bactérias presentes na superfície dos tetos, segundo Brito (2000), ocorre um aumento de dez vezes nesse número, ato que poderia ser facilmente evitado caso fosse realizado o *pré dipping* com desinfetantes logo após o bezerro mamar, reduzindo em mais de 90% o número de bactérias. E prevenindo assim novas infecções nas vacas. Segundo Ramalho, (2012) o uso de agentes desinfetantes antes da ordenha e após a mesma visa reduzir potencialmente a população de bactérias patogênicas e evitar sua disseminação no rebanho garantindo o controle da mastite.

A distribuição da frequência absoluta e frequência percentual dos tetos acometidos com *S. aureus* estão representadas nos gráficos abaixo (figuras 9 e 10).



**Figura 9.** Distribuição da frequência absoluta dos tetos de vacas bovinas acometidos com *S. aureus* nos diferentes tempos de observação.



**Figura 10.** Distribuição da frequência percentual dos tetos de vacas bovinas acometidos com *S. aureus* nos diferentes tempos de observação.

Nota-se na distribuição de frequências que houve redução da contagem de UFC de *S. aureus* nas amostras entre os tempos de observação após aplicação do ozônio, destacando-se os dias de maior redução o dia 10 e dia 30. De acordo Couto (2014) o ozônio levou a morte celular pela ruptura da membrana da bactéria

Com relação a frequência em D20 acredita-se em duas possibilidades, a primeira é de que houve uma reinfecção devido ao desafio ambiental a que as vacas estão sujeitas vide a falta de boas práticas de ordenha nas mesmas. A segunda é que em D10 a resposta imediata do ozônio no local da aplicação provocou diminuição da UFC e após 30 dias o efeito sistêmico do ozônio desencadeou ativação do sistema imune promovendo a redução da UFC observada em D30, já que Pereira (2006) notou que o período de cura da mastite com ozônio pode demorar até 30 dias.

Ao realizar a ANOVA entre as contagens de UFC para *S. aureus* relacionados ao dia e aos tetos, verificou-se que não houve diferença na variável teto, porém houve na variável dias (Tabela 2).

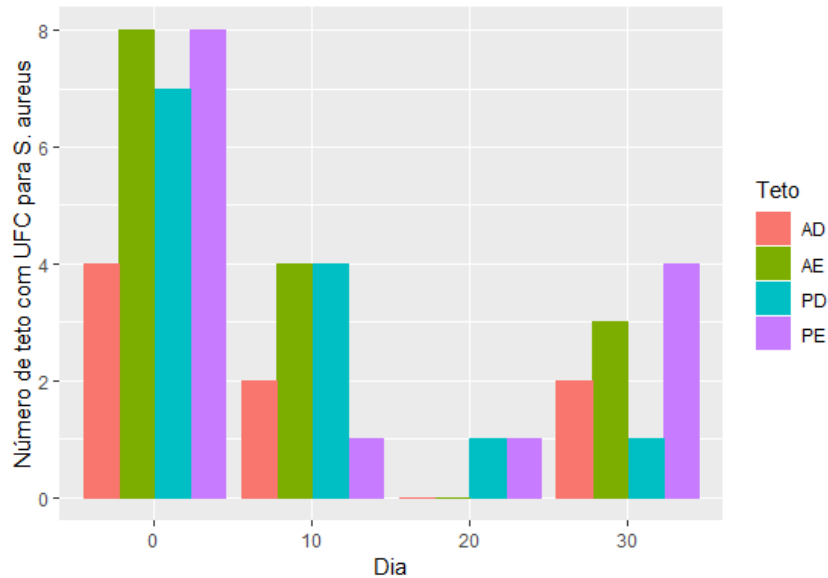
**Tabela 2.** ANOVA da contagem de UFC em relação ao dia de observação e ao teto da vaca.

Fonte de variação	Grau de liberdade	P-valor
Teto	3	0.2917142
Dia	1	0.0002127
Teto:dia	3	0.8961325

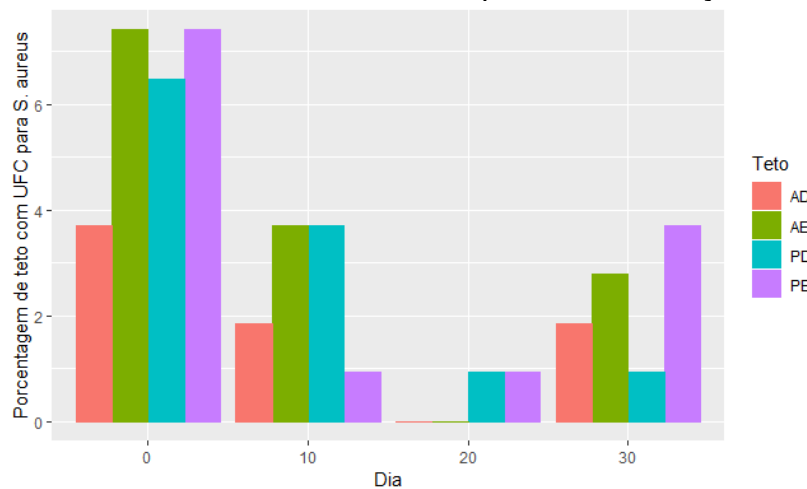
Na análise de Tukey no dia 0 em comparação ao dia 10 observa-se que houve diferença na contagem de UFC do *S. aureus* ( $p = 0.0014541$ ). Esta mesma diferença foi observada o dia 0 com o dia 30 ( $p = 0.0000667$ ), no dia 20 em relação ao dia 30 ( $p = 0.0171882$ ). No dia 30 com dia 10 não houve diferença ( $p = 0.8531232$ ) resultado esse esperado pela ação do ozônio. Portanto pode-se afirmar que houve eficácia do tratamento com ozônio sob a mastite subclínica de vacas entre esses dias. Contudo, entre os dias 0 e 20 ( $p = 0.4027707$ ) e dia 10 e 20 ( $p = 0.1318405$ ) houve uma provável reinfecção nesse período causado pelo grande desafio ao qual o rebanho está submetido, fato discutido anteriormente com relação a falta de boas práticas de manejo de ordenha, como realização de pré e pós *dipping*, bezeros realizando a primeira mamada, higienização frequente das mãos do ordenhador, da sala de ordenha, a qual muitas vezes as vacas defecavam ou urinavam e respingos caíam nas tetas e teteiras e somente ao final de toda ordenha a mesma era limpa. A não utilização de uma linha de ordenha rígida de acordo aos resultados do CMT também propiciam para uma reinfecção dos animais e a manutenção da mastite subclínica na propriedade.

### 5.3. Búfalas “in vivo”

A distribuição da frequência absoluta (figura 11) e frequência percentual (figura 12) dos tetos acometidos com *S. aureus* estão representadas no gráfico abaixo.



**Figura 11.** Distribuição da frequência absoluta dos tetos de búfalas acometidos com *S. aureus* nos diferentes tempos de observação.



**Figura 12.** Distribuição da frequência percentual dos tetos de búfalas acometidos com *S. aureus* nos diferentes tempos de observação.

Quando é realizada a ANOVA entre as contagens de UFC para *S. aureus* relacionados ao dia e aos tetos, observamos que também não houve diferença na variável teto, mas houve na variável dia de observação (tabela 3).

**Tabela 3.** Análise de variância na contagem de UFC por dia de observação e tetos de búfalas.

Fonte de variação	Grau de liberdade	P-valor
Teto	3	0.9455
Dia	1	1.94x10 <sup>-10</sup>
Teto:dia	3	0.7061

Na análise de Tukey no dia 0 em comparação ao dia 10 observa-se que houve diferença na contagem de UFC do *S. aureus* ( $p=0.0000035$ ). Esta mesma diferença foi observada o dia 0 com o dia 20 ( $p= 0.000000$ ), no dia 30 em relação ao dia 0 ( $p=0.000000$ ), no dia 20 em relação ao dia 10 ( $p = 0.0233725$ ). Portanto pode-se afirmar que houve eficácia do tratamento com ozônio sob a mastite subclínica de búfalas entre todos os dias.

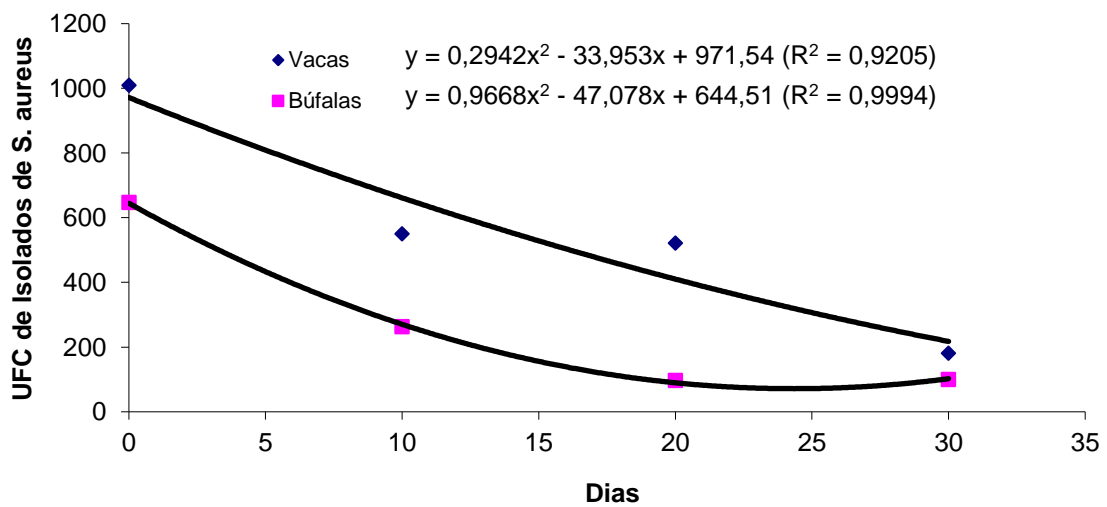
Assim como na propriedade de vacas bovinas, o manejo de ordenha nas búfalas não segue as boas práticas de ordenha, no qual os ordenhadores não realizam a higienização das mãos entre uma vaca e outra, apesar de estar presente o papel toalha e pia na sala de ordenha, os mesmos não seguem uma linha de ordenha baseada nos índices do CMT, que tampouco é monitorado. A sala de ordenha possui piso com paralelos o que dificulta a limpeza e correta higienização do ambiente, levando a um acúmulo de dejetos e favorecendo a contaminação.

A redução de UFC após 10 dias da aplicação do ozônio nas búfalas foi de 59,25%, enquanto que no dia 20 chegou a 92,59% de redução, valor semelhante ao encontrado por Cunha et al. (2006) de 97,98% utilizando a gentamicina “*in vitro*” nas amostras de búfalas. Considerado um feito excelente, quando o ozônio apresentou seu melhor resultado após aplicação. Já no dia 30 a redução foi de 66,66%. Baseados nessa informação podemos considerar em um protocolo de ozonioterapia para essas búfalas que envolva mais um ciclo de aplicação do ozônio após 20 dias da primeira aplicação, para assim alcançar o melhor resultado possível.

A prevalência de búfalas com mastite subclínica na propriedade foi de 29,98%, valor baixo conforme encontrado por Cunha et al. (2006), que encontrou uma prevalência de 41,41%, assim como Chander e Baxi com 35,44% e Kapur et al. (1992) com 36,67%. O qual mesmo com todas as condições inadequadas á qualidades do leite e sanidade dos animais ainda teve uma prevalência considerada baixa compara a outros autores, o que mostra que a influência desta pode estar relacionada a genética, nutrição e ao ambiente das búfalas nas diferentes propriedades.

Em búfalas o *Staphylococcus spp.* foi isolado em 46,2% dos casos de mastite bubalina (CHANDER e BAXI 1975), e Muhammad et al. (1997), encontrou o mesmo em 53,9% dos isolados, já Paranjape e Das (1986) o mesmo foi considerado o segundo microorganismo mais frequente isolado em sua pesquisa, com 10,39%. Sendo este um relevante microorganismo a ser considerado na mastite subclínica bubalina, em que o ozônio se mostrou uma excelente alternativa de controle.

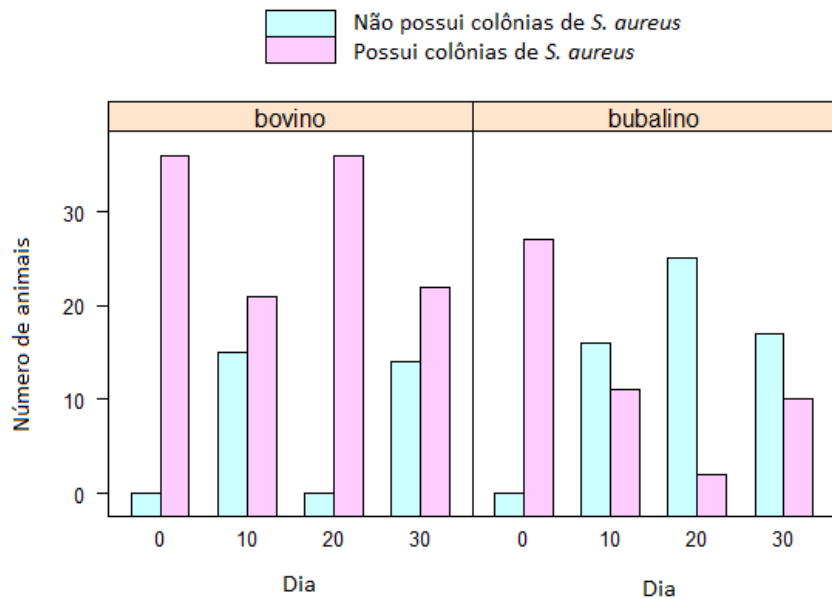
#### 5.4. Vacas e Búfalas “in vivo”



**Figura 13.** Regressão para UFCs de vacas e búfalas, no sul do estado da Bahia, submetidas a controle de mastite por 30 dias utilizando ozônioterapia. Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Ao compararmos os resultados de búfalas e vacas bovinas, houve maior redução de bactérias em búfalas, como demonstrado na (figura 13).





**Figura 14.** Comparação da contagem de UFC entre vacas e búfalas.

No dia 10; 38% das vacas e 59,25% das búfalas zeraram na contagem de UFC na amostra de leite; no dia 20; a contagem UFC das amostras de vacas não zeraram, já nas amostras de búfalas 92,59% zeraram; no dia 30 as vacas obtiveram 38% e as búfalas 66,66% de amostras zeradas.

Mesmo com todas as adversidades de manejo semelhantes entre as vacas e búfalas, e o maior contato das mesmas com áreas lamacentas, por ficarem submersas em aguadas, constantemente expondo o úbere ao contato direto ressalta-se que as búfalas apresentam algumas diferenças anatômicas em relação as vacas bovinas que lhe conferem maior resistência, como um ducto papilar revestido por um epitélio estratificado escamoso queratinizado, mais espesso do que nas vacas, e a musculatura ao redor do esfíncter do ducto papilar maior, mais organizada conferindo um fechamento mais firme do mesmo (AMARAL 2005). Além de diversas outras características como da cisterna do teto, na conformação do úbere e teto e na própria fisiologia do úbere, fazem com que a recontaminação após a aplicação do ozônio seja mais difícil. Portanto o fator biológico pode ter contribuído para a melhor resposta ao ozônio nas búfalas.

### 5.5. Vacas e Búfalas “in vitro”

**Tabela 4. Resultados de UFCs “in vitro” de isolados de *S. aureus* de leite de vacas e búfalas com mastite, submetidos ao gás ozônio.**

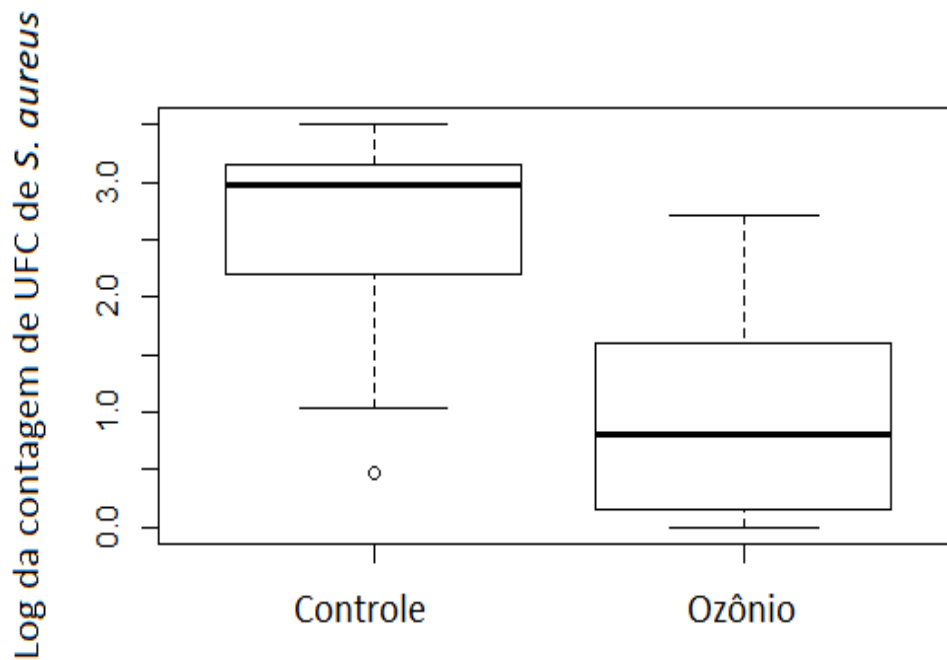
Espécies	Placa controle	Placa com ozônio	Redução
Vacas	985aA	54bA	94,50%
Búfalas	1091aA	60bA	94,50%
CV%	81,77	202,28	

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na coluna, diferem pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ); \*\* Controle = placa não foi submetida a infusão do gás ozônio.

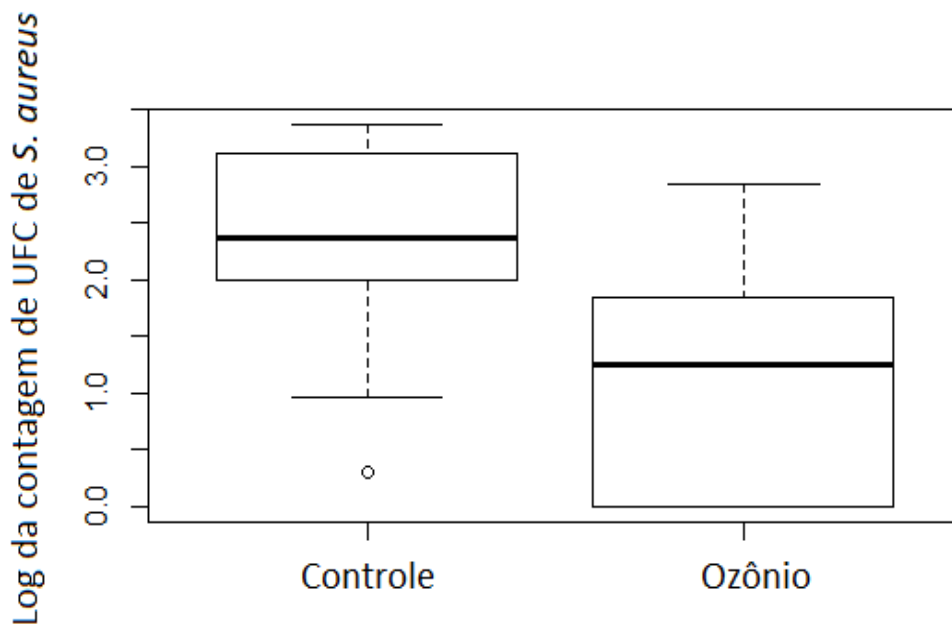
Quando realizada a verificação da média das contagens de UFC nas placas contendo isolados de *S. aureus* das vacas (Figura 14) e búfalas (Figura 15) submetidas a infusão do ozônio houve diferença entre a média de colônias contadas, ocorrendo uma diminuição das mesmas no pós-tratamento ( $p = 5.719 \times 10^{-12}$ ). Após infusão “in vitro”, 25% das amostras de vacas e 33% das de búfalas não apresentaram número de contagem bacteriana detectável.

Nessas condições, sugere-se que o tratamento com ozônio “in vitro” apresenta um efeito de redução das colônias de *S. aureus*.

Observa-se nos gráficos abaixo a presença de um *outlier* abaixo do valor mínimo no controle, tanto para vacas quanto para búfalas, porém este não interfere nos dados; por conseguinte em ambos os gráficos se nota redução da UFC, é nítida a diferença entre o valor superior dos controles e do ozônio, no controle os valores estão acima de 3.0 e no ozônio abaixo deste valor.



**Figura 15.** Comparação das contagens “*in vitro*” de UFC de *S. aureus* isolado de leite de vacas com mastite subclínica submetidos ao tratamento com ozônio.



**Figura 16.** Comparação das contagens “*in vitro*” de UFC de *S. aureus* isolado de leite de búfalas com mastite subclínica submetidos ao tratamento com ozônio.

Esses resultados corroboram com Fontes (2012), o qual aplicou ozônio “*in vitro*” em diferentes cepas bacterianas patogênicas (*Staphylococcus aureus*, susceptível a oxacillina, e *Staphylococcus aureus*, resistentes à vancomicina entre outras bactérias), obtendo como resultado que na concentração de 20mcg/L por 5 minutos de infusão na placa de petri foi suficiente para inibir completamente o crescimento bacteriano.

No presente trabalho a escolha da concentração foi de 44mcg/L por ser esta a mesma concentração utilizada nas vacas e búfalas via intramamária, de maneira a permitir uma igual comparação entre os dados.. A escolha da concentração, tempo, via de aplicação tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” e o tipo de manejo utilizado na fazenda irá definir o sucesso na utilização do ozônio como tratamento.

Sugere-se que este modelo de tratamento possa ser uma excelente alternativa no controle da mastite subclínica tanto em vacas quanto em búfalas evitando resíduos no leite e resistência microbiana e por poder ser utilizado em vacas em lactação. O tratamento em vacas em lactação com antibióticos segundo estudo de Zafalon et.al, (2007) demonstra não existir uma boa relação de custo-benefício sendo economicamente inviável. Em relação ao ozônio o custo do mesmo é muito baixo devido ao oxigênio utilizado para formar o gás ozônio ser de baixo custo e render muitas aplicações.

No presente trabalho também foi feita uma avaliação em algumas estirpes após a formação de biofilme (dados não demonstrados) e observou-se uma ação do ozônio na parede do biofilme, porém como não foi possível concluir a tempo da defesa os experimentos para estirpes em biofilme, estes não estão aqui relatados.

## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- A ozonioterapia mostrou-se eficaz no tratamento da mastite subclínica em vacas e búfalas reduzindo o número de quartos positivos ao CMT e em alguns quartos com a eliminação completa do patógeno.
- As búfalas apresentaram uma melhor resposta à ozonioterapia quando comparada as vacas bovinas. Em relação ao número de dias pós ozonioterapia as búfalas tiveram melhor resposta aos 20 e 30 dias pós ozônio respectivamente e as vacas aos 10 e 30 dias na mesma proporção de redução.
- O ozônio foi eficiente na diminuição da contagem de *S. aureus* “*in vitro*” com redução das contagens bacterianas e também em algumas estirpes a eliminação completa das mesmas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACTON, D. S., et al. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** n. 28, p. 115–127, 2009.
- ALVES, L. M. C., et al. Qualidade microbiológica do leite cru e queijo coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís – MA. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n.2, 01-13, 2009.
- AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. Corrêa. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 111-117, 2005.
- ANDRADE, H.H. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovinas no Distrito Federal e Entorno. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília. Brasília, 2012.
- ANUÁRIO leite 2018: indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2018. Páginas: p.114.
- BOCCI, Velio Alvaro. Scientific and medical aspects of ozone therapy. **State of the art. Archives of medical research**, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006
- BRAMLEY, A. J. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd I: isolation from bovine feces and from straw bedding of cattle. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, p. 369, 1982.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77 DE 26 DE Novembro de 2018. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: **Diário Oficial da União**, seção 1, Edição 30. 30 de novembro de 2018.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/ApresentaodadosgeraisDTA2015.pdf>. Acesso em 30 de outubro de 2017.
- BRITO, J. R. F., et al. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com

participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência rural**, v. 30, n. 5, 2000.

CÁFARO FILHO, Humberto et al. TRATAMENTO DE MASTITE EM OVINO CAUSADA POR *Prototheca sp.* ATRAVÉS DO OZÔNIO: RELATO DE CASO, 2014.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality. **Braz J Infect Dis**, v.9. n. 1, p. 70-6, 2005.

CHANDER, S. & BAXI, K.K. A note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.52, n.11, p.847-849, 1975.

COUTO, Emanuel Pereira. Efeito da ozonização na contagem da Staphylococcus aureus em leite. 2014.

CUNHA, A. P. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 17-21, 2006.

GARCIA, M. et al. **Manual de Semiologia e Clínica dos Ruminantes**. São Paulo, 1996. p. 77 a 82.

GUERREIRO, Paola Kiara et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Swiss Society of Food Science and Technology**, n. 37, 453–460, 2004

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 – **MAPA**

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KAPUR, M.P.; ANSHUSHARMA, R.; BHARDWAL, R.M. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v.11, n.2, p. 42-47, 1992.

KONEMAN, E. et al. Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1, n. 1, p. 70-6, 2005.

MACIEL, J. F., Carvalho, E. A., Santos, L. S., Araújo, J. B. D., & Nunes, V. S. (2008). Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 9(3).

MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**, Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

MANDHARE, M.N., Jagdale, D.M., Gaikwad, P.L., Gandhi, P.S., Kadam, V.J.,2012. Miracle of ozone therapy as an alternative medicine. *Int. J.Pharm. Chem. Biol. Sci.* 2, 63–71.

MARTINS, R. P et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MELO, Poliana de Castro et al. Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina. 2011.

MUHAMMAD, G.; L ODHI, L.A.; ATHAR, M.; REHMAN, F. Evaluation of cefhalexin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. **Indian Journal of Dairy Science**, n.50, v.3, p.205- 208, 1997

MURRAY, P. R. *Microbiologia Médica*, 6ª edição. Elsevier, 2010.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. 1.773p

NAGASE, N. et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J. Vet. Med. Sci.**, n. 64, 245-250, 2002.

NEDER, V., et al. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. **Revista Argentina de Microbiología**, n. 43, 104-106, 2011.

Ogata, A., Nagahata, H.. Intramammary application of ozonotherapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med. Sci.** 6, 2000.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* no leite e ambiente de ordenha em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. **Vet. e Zootec.**, v. 20, n. 2, Supl. 1, 34-35, 2013

OTTO, Michael. Staphylococcus aureus toxins. Current opinion in microbiology, v. 17, p. 32-37, 2014.

PARANJAPE, V.L. & DAS. A.M. Mastitis among buffalo population of Bombay: a bacteriological report. **Indian Veterinary Journal**, n.63, v.6, p.438-441, 1986.

PETON, V., LE LOIR, Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. **Infect. Genet. Evol.**, 2013.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning from cream filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v.28, n.6, p.406-409, 1994.

PEREIRA, M.T. C; GARCIA, C.A. Eficácia da ozonioterapia no tratamento de mastite subclínica de vacas em lactação. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 109-115, 2006.

PEREIRA, Marco Tulio Carrijo; DE ALMEIDA RIBEIRO, Sueli Cristina; DE CARVALHO, Saulo Fernandes Mano. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 2, 2003.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. *Virulence*, n.2, 2177-2197, 2010.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária – Um tratado de Doenças dos Bovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 541-629.

RAMALHO, Ayodhya C. et al. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

RESTAINO, L., et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol**, v.61, n. 9, 3471-3475, 1995.

ROBERSON, J. R., et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.** n. 77, p. 3354–3364, 1994.



SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M. de L.R. de. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**.v. 22, n.5, p. 458-461, 1988.

SAKWINSKA, O., et al. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.77, 5908-5915, 2011.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.313p.

SANTANA, E. H. W. Determinação do perigo de consumo de leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica. Defesa de tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SANTANA, E. H. W. Determinação do perigo de consumo de leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica. Defesa de tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SARGEANT, J. M. et al. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation<sup>1</sup>. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SCHALM O.W.; NOORLANDER D.O. Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 130(5):199-207. 1957.

SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**,v. 2, n. 6, 580-592, 2011.

SILVA, S. B. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, Londrina, 2011.

SOUZA, Faenia M.; NOGUEIRA, Messias S.; DA CRUZ NUNES, Fabiola. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado informalmente na cidade de Areia-PB. **Agropecuária técnica**, v. 32, n. 1, p. 169-172, 2011.

SOMMERVILLE, G. A; PROCTOR R. A. The Biology of Staphylococci. In: CROSSLEY K. B et al. (editores). **The staphylococci in human disease**, 3-18. New York, N.Y: Churchill Livingstone, 2009.

SMITH, B.P. Medicina interna de grandes animais. São Paulo: Manole Ltda, 2006.

SORET, J.L., 1865. Recherches sur la densité de l'ozone". **Comptes rendus de l'Académie des sciences** 61, 941.

SUNNEN, Gérard V. Ozone in medicine: overview and future directions. **J Adv Med**, v. 1, n. 3, p. 15974, 1988.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5a. edição São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.

VANDERHAEGHEN, Wannes et al. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 44-51, 2015.

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: Custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/69690>>

ZANARDI, I., Borrelli, E., Valacchi, G., Travagli, V., & Bocci, V. et al. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 4, p. 304-314, 2016.



## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da Pesquisa:** Utilização do ozônio “in vitro” e “in vivo” em *Staphylococcus aureus* isolados de vacas e búfalas com mastite subclínica

**Nome da Pesquisadora:** Raissa Barros Gracie Mery

**Professora Responsável:** Dra. Poliana de Castro Melo

**Nome dos demais participantes da equipe:** Tarciana Rocha Reis, Amanda Carneiro Cardoso.

- 1) **Natureza da pesquisa/aula:** O Sr. (Sra.) está sendo convidado (a) a autorizar a participação de seu (s) animal (is) nesta pesquisa que tem como finalidade coleta de material (**leite**), realização de testes para mastite e tratamento com **Ozonioterapia** das \_\_\_\_\_ positivas para **Mastite** causada por *Staphylococcus aureus*, submetidas ao seguinte tratamento: **Tratamento** \_\_\_\_\_ com mastite positiva para *Staphylococcus aureus* serão tratados durante **PERÍODO DE LACTAÇÃO** por aplicação intramamária do **OZÔNIO**. Realizando 1 aplicação diária durante 5 dias consecutivos por animal.
- 2) **Identificação dos animais:** \_\_\_\_ Fêmeas \_\_\_\_\_ de 16 a 96 meses, localizadas na fazenda \_\_\_\_\_ no município de \_\_\_\_\_ - Bahia.
- 3) **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) e professor (a) realizem todos os procedimentos necessários para os testes de mastite, coletas de amostras de leite e tratamentos dos animais positivos. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para os seus animais. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) e professor (a). Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).
- 4) **Sobre os dados necessários:** Serão realizadas coletas periódicas de amostras de leite a fim de monitorar parâmetros físico/químicos influenciados pelos tratamentos propostos, as vacas utilizadas terão seu histórico produtivo consultados para distribuição nos grupos de tratamentos
- 5) **Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008.

- 6) **Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora, professora e participantes da equipe terão conhecimento dos dados.
- 7) **Benefícios:** Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a mastite, possibilitando uma nova abordagem e tratamento a ser desenvolvido nesta pesquisa, viabilizando uma alternativa ao tratamento convencional da mastite com antibióticos e todas as suas implicações econômicas e sanitárias, influenciando diretamente na qualidade de vida dos animais. O conhecimento construído a partir desta pesquisa serão divulgados pelo pesquisador e professor (a) que se comprometem a propagar os resultados obtidos.
- 8) **Pagamento:** Não haverá custos em nenhuma etapa da pesquisa para o proprietário dos animais, a pesquisadora e professora se comprometem a arcar com todas as despesas necessárias.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seus animais nesta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

**Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.**

Eu, \_\_\_\_\_,  
 portador de RG/CPF n° \_\_\_\_\_,  
 telefone: \_\_\_\_\_, residente  
 à \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_, proprietário/responsável pelos animais  
 \_\_\_\_\_, espécie \_\_\_\_\_, autorizo  
 a utilizar os animais como sujeito de pesquisa para fins didáticos e científicos.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Responsável pela Propriedade

\_\_\_\_\_  
 Assinatura da Pesquisadora

\_\_\_\_\_  
 Assinatura da Professora Responsável

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

TELEFONES

Pesquisadora: \_\_\_\_\_

Professora: \_\_\_\_\_