

Produção de biofilmes por *Staphylococcus* spp. em vacas com mastite tratadas com homeopatia



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
45**

Produção de biofilmes por  
*Staphylococcus* spp. em vacas com  
mastite tratadas com homeopatia

*Luiz Francisco Zafalon  
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Teresa Cristina Alves  
Elka Machado Ferreira*

**Embrapa Pecuária Sudeste  
São Carlos, SP  
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Pecuária São Carlos**  
Rod. Washington Luiz, km 234  
13560-970 , São Carlos, SP  
Fone: (16) 3411-5600  
<https://www.embrapa.br/pecuaria-sudeste>  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Alexandre Berndt*

Secretário-Executivo

*Simone Cristina Méo Niciurea*

Membros

*Emília Maria Pulcinelli Camarnado, Mara Angélica  
Pedrochi, Maria Cristina Campanelli Brito,  
Milena Ambrosio Telles*

Revisão de texto  
*Milena Ambrosio Telles*

Normalização bibliográfica

*Mara Angélica Pedrocchi*

Editoração eletrônica

*Maria Cristina Campanelli Brito*

Foto da capa

*Juliana Sussai*

**1ª edição on-line: 2019**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Pecuária Sudeste

---

Zafalon, Luiz Francisco

Produção de biofilmes por *Staphylococcus* spp. em vacas com mastite tratadas  
com homeopatia. / Luiz Francisco Zafalon et al. — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária  
Sudeste, 2019.

19p. – (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 45).  
ISSN 1981-2078

1. Mamite. 2. Sanidade animal. 3. Glândula mamária. 4. Homeopatia 5.  
*Staphylococcus*. I. Zafalon, Luiz Francisco. II. Cunha, Maria de Lourdes Ribeiro  
de Souza da. III. Alves, Teresa Cristina. IV. Ferreira, E. M. V. Título. VI. Série.

---

CDD: 579.353

© Embrapa, 2019

## Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	8
Resultados e Discussão .....	11
Conclusões.....	16
Referências .....	17

## Produção de biofilmes por *Staphylococcus* spp. em vacas com mastite tratadas com homeopatia

Luiz Francisco Zafalon<sup>1</sup>

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>2</sup>

Teresa Cristina Alves<sup>3</sup>

Elka Machado Ferreira<sup>4</sup>

**Resumo** – No Brasil, a homeopatia é a principal forma de controle da mastite em rebanhos orgânicos. Entretanto, desconhece-se a capacidade desse tipo de tratamento de controlar bactérias patogênicas relevantes à saúde animal e humana, como aquelas do gênero *Staphylococcus*. Esses micro-organismos apresentam fatores de patogenicidade, como a produção de biofilmes e questiona-se a possibilidade de essas bactérias permanecerem na glândula mamária de vacas tratadas com homeopatia, mesmo após o uso destas terapias alternativas. Assim, buscou-se investigar *Staphylococcus* spp. em leite de vacas com tratamento homeopático contra a mastite e a formação *in vitro* de biofilmes por esses patógenos. As vacas lactantes foram divididas em dois grupos antes do início do experimento, com e sem tratamento homeopático. A pesquisa de produção de biofilme foi feita pelo método de aderência em placa de poliestireno, baseando-se na leitura da Densidade Óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria. As amostras foram classificadas em três categorias: Não Aderente (NA); Fraco Aderente (FRA); Forte Aderente (FOA). Os resultados foram analisados com o uso do teste do Qui-quadrado para investigar a associação entre o tratamento e a produção de biofilmes. A *Odds ratio* foi calculada para estabelecer se as chances de produção de biofilmes eram maiores em um ou em outro grupo de animais. A espécie de maior ocorrência nos grupos não tratado e tratado do decorrer do estudo foi *S. aureus*, 42,5% e 31,9% respectivamente. No grupo não tratado, duas (5%) espécies isoladas apresentaram forte aderência, *S. epidermidis* e *S. warneri*. Nos animais tratados com homeopatia, nove (13%) isolados foram classificados como forte-aderentes, destes, cinco (55,6%) eram *S. epidermidis*. As chances de aparecimento de biofilmes em *Staphylococcus* isolados em vacas tratadas foram maiores que no grupo não tratado. A capacidade de produção de biofilmes permaneceu como um fator de patogenicidade nas cepas de *Staphylococcus* isoladas no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com homeopatia.

**Termos para indexação:** Qualidade do leite, sanidade animal, glândula mamária.

<sup>1</sup> Médico Veterinário, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste. luiz.zafalon@embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga. mlrs.cunha@unesp.br

<sup>3</sup> Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. teresa.alves@embrapa.br

<sup>4</sup> Médica Veterinária. elka.ferreira@hotmail.com

## *Staphylococcus* spp. biofilm production in cows with mastitis treated with homeopathy

**Abstract** – The homeopathy is the main form of mastitis control in organic herds in Brazil. However, this treatment's ability to control pathogenic bacteria relevant to animal and human health such as *Staphylococcus* in unknown. *Staphylococci* present pathogenicity factors, such as the production of biofilms, and the possibility of these bacteria remaining in the mammary gland of cows treated with homeopathy is questioned, even after the use of these alternative therapies. This study investigated *Staphylococcus* spp. in the milk of cows treated with homeopathy and the *in vitro* formation of biofilms by these pathogens. The cows were divided in two groups: treated and untreated with homeopathy. The biofilm was characterized phenotypically by the adhesion method on polystyrene plates. The samples were classified as: (a) Non-adherent; (b) Weakly adherent; and (c) Strongly adherent. The results were analyzed using the Chi-square test to examine the association between treatment and biofilm production. The odds ratio was calculated to determine if one group of animals had a higher chance of producing biofilms than the other. *S. aureus* was the species with the highest occurrence in the untreated and treated groups during the study, i.e., 42.5% and 31.9%, respectively. In the untreated group, 2 (5%) bacteria presented strong adherence, *S. epidermidis* and *S. warneri*. The nine species (13%) identified in the cows treated with homeopathy were classified as strongly adherent, and five (55.6%) of them were *S. epidermidis*. The odds of isolating *Staphylococcus* biofilms in treated cows were higher than in the untreated group. The capacity of biofilm production remained a pathogenicity factor in *Staphylococcus* strains isolated in the milk of cows with subclinical mastitis treated with homeopathy.

Index terms: Milk quality, animal health, mammary gland.

## Introdução

A homeopatia é conhecida por ser uma terapia alternativa no tratamento da mastite bovina e tem despertado o interesse de técnicos e produtores (BARBOSA; NERO; AMBROSIO, 2013), em um momento em que os consumidores cada vez mais exigem uma produção de alimentos livres de resíduos tóxicos e métodos de criação que levem em consideração aspectos humanitários e não agressivos aos animais e ao meio ambiente (PIRES, 2005).

O gênero *Staphylococcus* está envolvido em aproximadamente 50% dos casos de mastite bovina, com prevalência de *S. aureus* nas formas subclínica e clínica (RADOSTITIS et al., 2007; TÜRKYILMAZ et al., 2010; UNAL; CINAR, 2012; MELLO et al., 2016). Outras espécies de *Staphylococcus* também podem causar a doença, como as negativas na prova da coagulase, tais como *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. simulans* e *S. epidermidis* (HAMADANI et al., 2013).

A sobrevivência dos patógenos bacterianos às condições adversas impostas pelo ambiente é possível pela expressão de seus diferentes fatores de virulência (THÄNERT et al., 2017), cujas funções primárias são inibir as respostas imunitárias do hospedeiro e contribuir para patogênese da mastite (ÜNA et al., 2012).

Dentre os fatores de virulência de *Staphylococcus* spp., podem ser citados os biofilmes, constituídos por bactérias que estão aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos de natureza proteica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON; STEWART PHILIP; GREENBERG, 1999). A presença de biofilmes contribui para a manutenção de espécies estafilocócicas no interior da glândula mamária e interfere nas medidas de prevenção empregadas para o controle da doença.

Há uma demanda urgente de estudos epidemiológicos dos agentes infecciosos da mastite bovina frente aos tratamentos que não utilizam antimicrobianos convencionais, de modo a conhecer os seus efeitos sobre os patógenos. Assim, objetivou-se investigar a formação de biofilmes por amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas em animais tratados e não tratados com medicamentos homeopáticos.

## Material e Métodos

### Características da propriedade rural e do rebanho

O trabalho foi conduzido em rebanho leiteiro experimental na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, SP, durante os meses de outubro de 2015 a setembro de 2016, composto por 46 vacas em lactação da raça Holandesa e animais desta raça cruzados com vacas da raça Jersey, cuja produção média diária era de 25 litros de leite. A ordenha era mecânica, realizada duas vezes ao dia (7h e 16h) em circuito fechado. Os animais em lactação foram submetidos aos mesmos procedimentos de manejo, antes, durante e após a ordenha, conforme recomendações técnicas para o controle da mastite.

### Seleção dos animais

A seleção inicial dos animais para a divisão dos grupos de forma homogênea foi realizada por meio do *California Mastitis Test* (CMT), contagem de células somáticas (CCS) e produção, além das análises microbiológicas do leite. A atribuição de escores após a realização do CMT foi feita conforme Domingues; Langoni (2001), considerando-se como resultados positivos ao teste a apresentação de formação de gel viscoso. Os resultados foram classificados de acordo com o grau de resposta inflamatória, atribuindo-se escores de um a três. As misturas de leite com reagente (CMT) que permaneceram inalteradas, sem a clara evidência de viscosidade, foram consideradas negativas.

As anotações da produção de leite foram realizadas após a ordenha completa de cada animal, por meio de medidores graduados nas linhas do leite da ordenhadeira mecânica. As amostras enviadas para as análises de CCS também foram oriundas destes medidores. A contagem de células somáticas foi determinada por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount 300® (SAMACOUNT, 1995). Para tanto, as amostras de leite foram colhidas e acondicionadas em frascos plásticos com capacidade para 60 mL, com adição de duas pastilhas de bronopol. As amostras foram enviadas a um laboratório de referência em qualidade do leite, credenciado



na Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), localizado em Piracicaba, SP. As colheitas para as análises microbiológicas foram feitas por meio de *pools* de amostras de todos os quartos mamários do animal.

## Diagnóstico microbiológico da mastite estafilocócica

As amostras de leite para a investigação microbiológica da etiologia da mastite foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990; BRITO; BRITO, 1999). As colheitas das amostras de leite foram realizadas na primeira ordenha diária (MANSUR et al., 2005) e, então, conduzidas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia da Embrapa Pecuária Sudeste. O diagnóstico microbiológico da mastite foi realizado por meio da semeadura das amostras de leite sobre a superfície de placas de Petri em ágar acrescido de sangue ovino desfibrinado a 5%, incubadas em condições de aerobiose a 37°C. As leituras das placas foram realizadas após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação. Foram observadas as características macroscópicas das colônias e realizada identificação posterior, segundo as características morfológicas e bioquímicas (KONEMAN et al. 2001).

As cepas catalase e coagulase positivas foram submetidas às provas de produção de acetoina e fermentação dos açúcares maltose e trealose, possibilitando a diferenciação entre as cepas coagulase-positivas e cepas de *S. aureus*, enquanto as coagulase negativas foram submetidas aos testes de sensibilidade à furazolidona e de oxidase para a diferenciação entre as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* (KRIEG; HOLT, 1994; ALMEIDA et al., 2005). Posteriormente, as espécies de estafilococos coagulase-negativos foram identificadas por meio do método simples modificado, proposto por Cunha; Sinzato; Silveira (2004), com observação da fermentação ou não dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, verificação da produção de hemolisina e crescimento anaeróbico em caldo tioglicolato.

## Tratamento homeopático

A escolha da composição da formulação homeopática foi fundamentada em indicação técnica especializada da área de homeopatia, que colaborou no preparo das formulações e na indicação da forma de administração. Os princípios ativos, *Beladonna* (12CH), *Hepar sulphur* (12CH), *Silicea* (12CH), *Phosphorus* (12CH) e *Phytolacca decandra* (12CH), do composto homeopático foram acrescentados à alimentação das vacas em lactação, enquanto os animais não tratados receberam placebo, com adição de açúcar na ração, sem os princípios ativos homeopáticos. A formulação homeopática (5 mL) foi diluída em açúcar cristal (500 g) em bacia de aço inoxidável com o uso de colher também de aço inoxidável. Essa mistura foi adicionada a 30 Kg de sal. Esse preparo foi fornecido junto ao concentrado, sendo 2 kg por animal ao dia, durante 11 meses, de novembro de 2015 a setembro de 2016.

## Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno

A pesquisa de produção de biofilme em placas de cultura foi feita por meio do método proposto por Christensen et al. (1985), utilizado com modificações propostas por Oliveira; Cunha (2010). Esse método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da Densidade Óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria. Foram utilizadas culturas em *Trypticase Soy Broth* (TSB), incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 no mesmo meio, preparado com 2% de glicose. As placas foram previamente esterilizadas, compostas por 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*) e os poços foram preenchidos em quadruplicata, com 200µL da cultura diluída. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, posteriormente, o conteúdo de cada poço foi primeiramente aspirado e em seguida lavado por quatro vezes, com 200µL de tampão fosfato salina (PBS), a um pH de 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por uma hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2%, durante um minuto e, em seguida, o volume aspirado e o excesso de corante retirado, por meio da lavagem das placas com água destilada. A nova secagem das placas foi feita em temperatura ambiente, por 60 minutos, com leitura posterior da densidade óptica em leitor de Elisa, da marca Labssystem modelo Multiskan EX em filtro 540 nm.

A determinação do ponto discriminativo (ponto de corte) foi realizada com uma placa inteira, contendo TSB estéril, com determinação da média (M) e o desvio padrão (DP) (CHRISTENSEN et al., 1985), e posterior multiplicação do desvio padrão por três e adição do valor da média da DO da amostra de TSB estéril no mesmo comprimento de onda, segundo a fórmula: (Ponto de corte =  $DP \times 3 + M$  da DO do TSB estéril). As amostras foram classificadas em três categorias: não aderente, DO igual ou menor que o ponto de corte; fraco aderente, DO maior que o ponto de corte ou igual ou menor que o dobro desse valor; forte aderente, DO maior que o dobro do ponto de corte.

## **Análise dos dados**

Os resultados foram analisados com o uso do teste do Qui-quadrado para investigar a associação entre o tratamento e a produção de biofilmes. A Odds ratio (OR) foi calculada para estabelecer se as chances de produção de biofilmes eram maiores em um ou em outro grupo de animais. Foi usado o intervalo de confiança de 95%. As análises foram conduzidas com o uso do programa estatístico online Statulator (AGRESTI, 2012; DHAND; KHATKAR, 2014).

As atividades constantes nesse trabalho apresentam cadastro no SisGen sob nº ABE9211.

## **Resultados e discussão**

A Tabela 1 apresenta a etiologia infecciosa da mastite subclínica bovina causada por micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, em animais com e sem tratamento pela formulação homeopática, no decorrer do período em que o leite foi obtido das vacas.

**Tabela 1.** Mastite subclínica estafilocócica em vacas tratadas e não tratadas com homeopatia durante 11 meses.

Micro-organismos	Vacas tratadas	Vacas não tratadas	Total
<i>S. aureus</i>	22 (31,9%)	17 (42,5%)	39 (35,8%)
ECP <sup>1</sup>	14 (20,3%)	7 (17,5%)	21 (19,3%)
<i>S. epidermidis</i>	14 (20,3%)	5 (12,5%)	19 (17,4%)
<i>S. hyicus</i>	5 (7,2%)	4 (10,0%)	9 (8,3%)
ECN <sup>2</sup>	3 (4,4%)	4 (10,0%)	7 (6,4%)
<i>S. chromogenes</i>	5 (7,2%)	-	5 (4,6%)
<i>S. simulans</i>	4 (5,8%)	1 (2,5%)	5 (4,6%)
<i>S. xylosus</i>	1 (1,4%)	1 (2,5%)	2 (1,8%)
<i>S. warneri</i>	1 (1,4%)	1 (2,5%)	2 (1,8%)
<b>Total</b>	<b>69 (100,0%)</b>	<b>40 (100,0%)</b>	<b>109 (100,0%)</b>

<sup>1</sup> Estafilococos coagulase-positivos.

<sup>2</sup> Estafilococos coagulase-negativos.

*S. aureus* foi a espécie de maior ocorrência no leite de vacas com mastite subclínica nos grupos com e sem tratamento, 31,9% e 42,5%, respectivamente. Estafilococos coagulase-positivos e *S. epidermidis* apresentaram ocorrências de 19,3% e 17,4%, respectivamente, quando considerada a etiologia infecciosa da doença independentemente do tratamento homeopático. Apesar de existirem relatos na literatura de que a prova da coagulase é suficiente para a classificação da espécie bacteriana como *S. aureus*, optou-se por não considerar todas as espécies coagulase-positivas como pertencentes a essa espécie. Essa conduta não interferiu nas conclusões do trabalho. As espécies classificadas como estafilococos coagulase-negativos foram assim classificadas porque a metodologia usada não determinou a espécie bacteriana em todas as amostras investigadas. A ausência de identificação de todas as espécies coagulase-negativas também não interferiu nas conclusões do trabalho.

A ocorrência mais elevada de *S. aureus* na etiologia da mastite bovina também foi relatada por outros autores, os quais o consideraram como o principal patógeno causador de mastites, devido ao impacto causado na qualidade do leite e também pelas reduzidas taxas de cura após o tratamento (DUARTE et al., 2017). Depreende-se que, mesmo após o uso de terapias não convencionais como a homeopatia, esse micro-organismo continuou presente no rebanho. A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa.

Tabela 2. Classificação de *Staphylococcus* spp. isolados em amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, de acordo com a aderência em placas de poliestireno para a pesquisa de produção de biofilmes, com respectivas contagens médias de células somáticas.

Resultados	Vacas tratadas		Vacas não tratadas		Total
	N (%)	CCS (Médias geométricas)	N (%)	CCS (Médias geométricas)	
Negativo	37 (53,6%)	224x10 <sup>3</sup>	31 (77,5%)	171x10 <sup>3</sup>	68 (62,4%)
Aderência fraca	23 (33,3%)	221x10 <sup>3</sup>	7 (17,5%)	239x10 <sup>3</sup>	30 (27,5%)
Aderência forte	9 (13,1%)	521x10 <sup>3</sup>	2 (5%)	213x10 <sup>3</sup>	11 (10,1%)
Total	69 (100,0%)	248x10 <sup>3</sup>	40 (100%)	185x10 <sup>3</sup>	109 (100%)

*S. aureus* não apresentou forte aderência no teste para investigação de produção de biofilmes, apesar de ser a espécie de maior ocorrência nas vacas tratadas e não tratadas no decorrer do estudo. Nos animais não tratados, duas (5%) espécies isoladas apresentaram forte aderência, *S. epidermidis* e *S. warneri*. Somente no animal em que *S. epidermidis* foi isolado a CCS foi superior a 200.000 células ml<sup>-1</sup> de leite. Por outro lado, nos animais tratados com homeopatia, nove (13,1%) isolados foram classificados como forte-aderentes. Dentre esses, cinco (55,6%) eram *S. epidermidis*. Em todas as vacas em que esta espécie foi isolada, CCS foram superiores a 990.000 células ml<sup>-1</sup> de leite. A formação mais forte de biofilmes por *S. epidermidis* também foi observada por Simojoki et al. (2012), quando estudaram diferentes espécies de estafilococos coagulase-negativos, porém, esses autores não encontraram associação entre a produção de biofilme e a intensidade da resposta inflamatória.

Uma relação entre a resposta inflamatória na glândula mamária e a produção de biofilmes é difícil de ser estabelecida. Comumente, um quadro infeccioso de mastite subclínica está relacionado com CCS superior a 200.000 células mL<sup>-1</sup> de leite (ANDERSEN et al., 2010) e observou-se que, mesmo estafilococos coagulase-negativos, que nem sempre são reconhecidos como relevantes na etiologia da doença, acarretaram altas respostas celulares (dados não tabelados). Porém, é bem estabelecido que a habilidade de espécies estafilocócicas em produzir biofilmes é um fator que afeta a persistência de bactérias por longos períodos na glândula mamária e pode resultar em mastite crônica e redução da eficácia da terapia antimicrobiana (MELO et al., 2013; VEH et al., 2015).

O percentual de espécies estafilocócicas que foram negativas pelo método de aderência em placas foi superior nos animais sem tratamento, 77,5%, contra 53,6% nas vacas tratadas com homeopatia. A metodologia empregada no presente estudo para a detecção de biofilmes é considerada uma técnica mais adequada que outros testes *in vitro* como o Agar Vermelho Congo, por exemplo, por apresentar maior sensibilidade diagnóstica, o que credencia essa técnica como um teste de primeira escolha para a identificação de amostras produtoras de biofilme. Entretanto, a possibilidade de resultados falso-negativos pode aumentar quando a produção de biofilmes não está ligada aos genes diferentes do *icaA* e *icaD*, relacionados com a detenção de polissacarídeos intracelulares e que são os principais componentes dos biofilmes (MELO et al., 2013).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de *odds ratio* após a investigação da associação entre o tratamento homeopático e a produção de biofilmes.

**Tabela 3.** Associação entre o tratamento homeopático e a produção de biofilmes.

Variáveis explanatórias	Biofilme			Odds (95% IC*)	Valor de P
	Sim	Não	Total		
Tratamento	Sim	32 (46,38%)	37 (53,62%)	69 (1,24 - 7,18)	0,013
	Não	9 (22,50%)	31 (77,50%)	40	

\* Intervalo de confiança.

Houve associação significativa entre o tratamento homeopático e a produção de biofilmes nas vacas tratadas ( $P=0,013$ ), e as chances de aparecimento de biofilmes em *Staphylococcus* isolados em vacas tratadas foi 2,98 vezes maior (1,24 - 7,18), quando comparado com o grupo não tratado.

Segundo Thanert et al. (2017), os princípios ativos homeopáticos podem tornar as defesas imunes das vacas mais competentes e tornar os hospedeiros mais resistentes aos desafios impostos pela invasão bacteriana em animais tratados. Entretanto, a patogênese bacteriana deve ser considerada na tríade epidemiológica relacionada com a mastite, pois ela é fortemente influenciada pela capacidade de resposta e por características inerentes do hospedeiro. A resposta imunológica a um patógeno específico pode variar em um hospedeiro susceptível e os fatores de virulência são essenciais para o estabelecimento da doença.

Os resultados sugerem a possibilidade de os estafilococos terem apresentado mais chances de produzirem biofilmes para se protegerem das defesas imunológicas dos animais, uma das possíveis justificativas para que a eficácia do tratamento não tenha proporcionado diferenças nas taxas de cura entre vacas tratadas e não tratadas, conforme resultados anteriores (ZAFALON; ALVES; CHAGAS, 2017). A produção de biofilmes foi superior nas vacas tratadas, um fator de virulência que pode proporcionar a manutenção do agente etiológico na glândula mamária. A manutenção de fontes de infecção para outros animais, representada pela permanência de micro-organismos nas glândulas mamárias, também foi relatada anteriormente por Sakiyama (2010), após tratamento homeopático.

Antes do uso de formulações homeopáticas, a participação de um profissional técnico especializado em homeopatia é fundamental para o acompanhamento do rebanho, pois os princípios podem ser diferentes na dependência da etiologia infecciosa ou mesmo das características dos animais em lactação. A escolha da formulação homeopática utilizada no presente trabalho foi decorrente do conhecimento prévio da etiologia infecciosa da mastite, obtido por meio de informações anteriores relacionadas ao acompanhamento do rebanho. Outros autores enfatizam a demanda por um diagnóstico correto dos micro-organismos envolvidos na etiologia das mastites, de modo que se possa fornecer informações para a obtenção de uma alta eficácia do tratamento homeopático (WERNER; SOBIRAJ; SUNDRUM, 2010).

A caracterização mais detalhada do patógeno causador da mastite pode contribuir com a avaliação da possibilidade de transmissão dos micro-organismos e o desenvolvimento da doença, fornecendo informações importantes para a escolha de métodos apropriados de profilaxia e terapia, mesmo em rebanhos submetidos a tratamentos não convencionais (KASNOWSKI et al., 2010). Outro fator relevante quanto à escolha de tratamentos alternativos é a manutenção de agentes infecciosos, como *Staphylococcus* spp., na glândula mamária de animais assintomáticos, uma vez que esses agentes podem ser fonte de infecção de novos animais e impedir a melhoria da qualidade do leite do produtor que usa essa forma de tratamento da mastite.

## Conclusões

A capacidade de produção de biofilmes permaneceu como um fator de patogenicidade nas cepas de *Staphylococcus* isoladas no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com homeopatia.



## Agradecimentos

- A Adrielle Bassanezi Seixas, Benedito Aparecido da Silva, Carlos Juarez Filgueiras, Carolina Orlando Vaso, Gilberto César Agostinho, José Cosme Machado e Márcio Dias Rabelo.

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo Fapesp nº 2017/08979-7.

## Referências

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 3 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2012.

ALMEIDA, L. A. B.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PIRES, M. F. A.; BENITES, N. R. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.1-6, 2005.

ANDERSEN, S.; DOHOO, I. R.; OLDE RIEKERINK, R.; STRYHN, H.; MASTITIS RESEARCH WORKERS' CONFERENCE. Diagnosing intramammary infections: evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.7, p.2966–2975, 2010.

BARBOSA, A. S.; NERO, B. D.; AMBROSIO, C. E. Terapia homeopática em dermatopatias de gatos: revisão de literatura. **Acta Veterinária Brasileira**, v.7, n.1, p.29-37, 2013.

BRITO, M. A. V. P. e; BRITO, J. R. F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Técnica, 55).

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YONGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.6, p.996-1006, dec. 1985.

COSTERTON, J. W.; STEWART PHILIP, S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

CUNHA, M. L. R. S; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for identification of coagulase-negative Staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.855-860, 2004.

DHAND, N. K.; KHATKAR, M. S. **Statulator**: an online calculator that conducts statistical analyses and interprets the results. 2014. Disponível em: <http://statulator.com>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. **Manejo sanitário animal**. Rio de Janeiro: Publicações Biomédicas, 2001. 210 p.

- DUARTE, C. M.; CARNEIRO, C.; CARDOSO, S.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Semi-quantitative method for *Staphylococci* magnetic detection in raw milk. **Journal of Dairy Research**, v.84, p.80-88, 2017.
- HAMADANI, H.; KHAN, A. A.; BANDAY, M. T.; ASHRAF, I.; HANDOO, N.; SHAH, S. B.; HAMADANI, A. Bovine mastitis: a disease of serious concern for dairy farmers. **International Journal of Livestock Research**, v.3, n.1, p.42-55, 2013.
- HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.
- KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.15, p.1-23, 2010.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.984.
- MANSUR, J. R. G.; BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; COUTO, M. V. Amostragem da produção diária de leite para contagem de células somáticas e determinação da composição centesimal. **Higiene Alimentar**, v.19, n.130, 2005 (encarte eletrônico).
- MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G.; SOUZA, V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.119-124, 2013.
- MELLO, P. L.; RIBOLI, D. F. M.; PINHEIRO, L.; MARTINS, L. A.; BRITO, M. A. V. P.; CUNHA, M. L. R. S. Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from bovine subclinical mastitis in different brazilian states. **Toxins**, v.8, n.4, 2016.
- OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. R. S. C. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**, v.3, n.260, 2010.
- PIRES, M. F. A. **A homeopatia para os animais**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 4 p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 46).
- RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p.2156.
- SAKIYAMA, D. T. P. **Avaliação dos medicamentos homeopáticos Sulphur 30CH e Calcarea carbonica 30CH para tratamento de vacas com mastite subclínica**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; PLUMED-FERRER, C.; TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Veterinary Microbiology**, v.158, n.3-4, p.344-352, 2012.
- SOMACOUNT 300: operator's manual. Chaska: Bentley Instruments, 1995. 12p.

THÄNERT, R.; GOLDMANN, O.; BEINEKE, A.; MEDINA, E. Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during *in vivo* infection. **Nature Communications**, p.1-3, 2017.

TÜRKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.197-203, 2010.

ÜNA, N.; ASKAR, S.; MACUN, H. C.; SAKARYA, F.; ALTUN, B.; YILDIRIM, M. Panton-valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile of staphylococci isolated from milks of small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.573-579, 2012.

UNAL, N.; CINAR, O. M. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and panton-valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.369-375, 2012.

VEH, K. A.; KLEIN, R. C.; STER, C.; KEEFE, G.; LACASSE, P.; SCHOLL, D.; ROY, J. P.; HAINE, D.; DUFOUR, S.; TALBOT, B. G.; RIBON, A. O. B.; MALOUIN, F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.1, p.155-168, 2015.

WERNER, C.; SOBIRAJ, A.; SUNDRUM, A. Efficacy of homeopathic and antibiotic treatment strategies in cases of mild and moderate bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Research**, v.77, p.460-467, 2010.

ZAFALON, L. F.; ALVES, T. C.; CHAGAS, A. C. de S. **Uso de homeopatia para o controle da mastite subclínica bovina**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2017. 29 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 41).

**Embrapa**

---

***Pecuária Sudeste***

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL

CGPE: 15298