

São Carlos, SP / Janeiro, 2024

Suscetibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino após tratamento homeopático

Larissa Cristina Brassolatti⁽¹⁾, Camila Chioda de Almeida⁽²⁾, Teresa Cristina Alves⁽³⁾ e
Luiz Francisco Zafalon⁽³⁾

⁽¹⁾ Discente de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp Jaboticabal, Jaboticabal, SP.
⁽²⁾ Doutora em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp Jaboticabal, Jaboticabal, SP. ⁽³⁾ Pesquisadores, Embrapa Pecuaría Sudeste, São Carlos, SP.

Resumo – Formas não convencionais para tratamento e controle da mastite bovina são usadas nos rebanhos no manejo orgânico. A homeopatia é a principal. São desconhecidas possíveis alterações nos perfis de suscetibilidade antimicrobiana aos princípios ativos que fazem parte dos medicamentos quando o rebanho é tratado com homeopatia. Objetivou-se caracterizar a ocorrência e os perfis de resistência antimicrobiana in vitro em *Staphylococcus* spp., isolados em leite de vacas de rebanho com histórico de tratamento da mastite com homeopatia, durante e após o tratamento; investigar genes de resistência antimicrobiana; e comparar os índices de mastite causada por esses micro-organismos em vacas submetidas ao tratamento com homeopatia e em período posterior, sem a homeopatia. Testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados por disco-difusão a partir de discos com os princípios ativos penicilina, gentamicina, enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, nitrofurantoína, tetraciclina, doxiciclina, sulfazotrim, oxacilina, cefalexina e sulfatoprim. Não houve diferença nos perfis de suscetibilidade entre os períodos de uso e não uso da homeopatia. Identificou-se em frequência superior genes ligados à resistência antimicrobiana durante o tratamento com homeopatia. Houve potencial presença de resistência antimicrobiana in vitro em *Staphylococcus* spp. quando as vacas estavam sendo tratadas com homeopatia, assim como ocorrência da doença causada por estes micro-organismos.

Termos para indexação: homeopatia, mastite bovina, resistência antimicrobiana.

In vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine milk after homeopathic treatment

Abstract – Unconventional methods of treating and controlling bovine mastitis are used in organically managed herds. Homeopathy is the main unconventional method used, but the potential impact of homeopathy on antimicrobial susceptibility profiles to the active principles in common medicines is unknown. The objective of this study was to characterize the occurrence and profiles of in vitro antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from herd cows with a history of mastitis treatment with homeopathy, during and

Embrapa Pecuaría Sudeste

Rod. Washington Luiz, Km 234
13560-970, São Carlos, SP
www.embrapa.br/pecuaria-sudeste
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

André Luis Monteiro Novo

Secretário-executivo

Luiz Francisco Zafalon

Membros

Gisele Rosso, Mara Angélica

Pedrochi, Maria Cristina

Campanelli Brito, Silvia Helena

Picirillo Sanchez

Revisão de texto

Gisele Rosso

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi (CRB-8/6556)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Maria Cristina Campanelli Brito

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

after treatment. Additionally, the study investigated antimicrobial resistance genes and compared mastitis rates caused by these microorganisms in cows subjected to homeopathy treatment and in a later period without homeopathy. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disc diffusion using discs impregnated with the active principles penicillin, gentamicin, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin, nitrofurantoin, tetracycline, doxycycline, sulfazotrim, oxacillin, cephalexin, and sulfatoprim. No difference in susceptibility profiles was identified between periods of homeopathy use and non-use. However, genes associated with antimicrobial resistance were identified at a higher frequency during homeopathic treatment. These results suggest that there is a potential presence of in vitro antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. when cows are being treated with homeopathy, as well as the occurrence of disease caused by these microorganisms.

Index terms: Homeopathy, bovine mastitis, antimicrobial resistance.

Introdução

A mastite é a inflamação da glândula mamária. Uma doença plurietiológica e multifatorial, associada principalmente a micro-organismos que invadem o úbere por meio dos óstios dos tetos, multiplicando-se nos tecidos mamários (Alves; Moreira, 2021). A doença é causada por micro-organismos patogênicos contagiosos, que podem estar no ambiente onde o animal permanece e durante a ordenha principalmente bactérias. No entanto, a infecção também pode ser causada por fungos e algas (Massote et al., 2019).

A mastite subclínica é de grande relevância dentre as formas da doença. Sua manifestação não é aparente e apresenta maior prevalência econômica que a forma clínica, além de ser de difícil diagnóstico por não ser visível (Fonseca et al., 2021). A forma subclínica pode afetar negativamente a composição do leite, com redução dos teores de caseína, lactose, gordura, cálcio e o aumento de proteínas séricas (Melo, 2021). Sua identificação pode ser feita por meio de testes que identifiquem alterações decorrentes do processo infeccioso, como o aumento da contagem de células somáticas (CCS) e a visualização de viscosidade durante a realização do California Mastitis Test (CMT), além da confirmação diagnóstica por exames laboratoriais em meios de cultivo microbiológico (Melo, 2021).

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos isolados em casos de mastite, decorrente de sua fácil disseminação entre bovinos. Algumas cepas de *Staphylococcus* são capazes de formar biofilmes, o que pode comprometer a eficácia da antibioticoterapia, usada para combater a mastite, ocasionando resistência antimicrobiana durante os tratamentos da doença (Damasceno; Silva; Santos, 2020). *S. aureus* também tem a capacidade de produzir fatores de virulência que podem estar relacionados com a adaptação e adesão das bactérias a diferentes hospedeiros e fatores, podendo influenciar na ação dos antimicrobianos (Conrad, 2014).

O impacto dos antimicrobianos no leite e a preocupação com a segurança alimentar têm potencial de estabelecer uma diminuição no uso de medicamentos convencionais e o aumento do interesse por tratamentos alternativos (Jesus; Coutinho, 2018). A introdução de novos antibióticos não pode ser entendida como uma solução duradoura para os rebanhos, considerando o surgimento de clones bacterianos resistentes, cada vez mais prevalentes sob pressão seletiva da toxicod dependência, com necessidade de medicamentos que não imponham níveis de pressão de seleção semelhantes aos medicamentos clássicos. Tal fato tem motivado terapias alternativas como a homeopatia (Thänert et al., 2017).

A homeopatia propõe uma abordagem terapêutica e clínica do paciente, sendo considerada uma ciência da saúde que utiliza princípios básicos de medicamentos dinamizados, preparados a partir de substâncias minerais, vegetais, animais e de tecidos doentes (Costa Filho et al., 2014). O uso da homeopatia tem sido propagada desde a clínica de grandes animais e em animais de companhia (Costa, 2015).

Por outro lado, 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 (Kot et al., 2016).

A identificação etiológica das estirpes estafilocócicas envolvidas na etiologia da mastite bovina tem a capacidade de estabelecer se há diferenças entre os micro-organismos isolados no leite de animais submetidos à homeopatia quanto às características de resistência antimicrobiana e se a ocorrência desses micro-organismos pode continuar em patamar semelhante em período posterior ao

uso do tratamento não convencional. O resultado traria maior compreensão sobre o comportamento de bactérias do gênero *Staphylococcus* em rebanho submetido ao tratamento homeopático durante a lactação. Assim, objetivou-se caracterizar a prevalência da mastite causada por *Staphylococcus* spp. e a ocorrência de perfis de resistência antimicrobiana in vitro desses micro-organismos em leite de vacas tratadas com homeopatia e após esse tratamento, além da investigação dos genes ligados à resistência antimicrobiana.

Material e métodos

Características do rebanho e práticas de manejo

As amostras foram coletadas mensalmente de vacas em lactação. O rebanho era composto por 50 animais entre 15 e 235 dias de lactação das raças Holandesa, Jersey e seus cruzamentos no Sistema de Produção de Leite da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP, em dois períodos: durante e após tratamento homeopático preventivo contra mastite. As coletas de amostras foram realizadas três anos depois de finalizado o uso da homeopatia.

A ordem de ordenha das vacas no processo de ordenha mecânica ocorria em lotes, de acordo com a data de parto e a produção de leite, e, na ordenha voluntária, os animais eram ordenhados conforme a produção ou o tempo desde a última ordenha. As vacas foram submetidas aos procedimentos de lavagem dos tetos antes da ordenha, com água clorada segundo manejo da propriedade e, em seguida, secagem com papel toalha descartável. A concentração de cloro residual livre na água de lavagem dos tetos era entre 0,5 mg/L e 2,0 mg/L, com média de resultados diários em torno de 1,2 mg/L. Posteriormente, era feita a antisepsia pré-ordenha, com produtos constituídos de solução de Hipoclorito de sódio na concentração de 1%. Após nova secagem dos tetos com papel toalha descartável, era realizada a ordenha completa das vacas, com posterior antisepsia pós-ordenha. O teste da caneca telada para a identificação de casos clínicos de mastite foi realizado em todas as ordenhas.

Terminada a ordenha, os animais recebiam alimentos para que se mantivessem em estação. O manejo de ordenha dos animais do rebanho não apresentou alterações quando comparado com o período em que houve o tratamento. Entretanto, houve redução do número de vacas em lactação durante um único mês na avaliação realizada após

o tratamento com homeopatia, devido alteração do manejo na fazenda experimental. Os animais passaram a ser ordenhados no sistema robótico e voluntário, ocorrendo alterações que não inferiram nas vacas para a coleta das amostras do período após o tratamento.

Obtenção das amostras de leite durante e após a realização do tratamento

As vacas em lactação foram submetidas inicialmente ao California Mastitis Test (CMT) para diagnóstico prévio dos casos de mastite subclínica. A atribuição de escores após a realização do CMT foi realizada conforme Domingues; Langoni; Ferreira Junior (2001), considerando-se como resultados positivos ao teste a apresentação de formação de gel viscoso. As misturas de leite com reagente (CMT) que permaneceram inalteradas, sem a clara evidência de viscosidade, foram consideradas negativas.

Posteriormente, amostras de leite foram obtidas para a identificação da etiologia infecciosa e avaliação da contagem de células somáticas (CCS). As análises microbiológicas foram feitas por meio da colheita de um pool de amostras de leite dos quartos mamários de cada vaca, de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (Harmon et al., 1990; Brito; Brito, 1999). Os primeiros jatos de leite de cada quarto mamário foram descartados antes das colheitas das amostras e as extremidades dos tetos foram higienizadas com algodão umedecido com álcool etílico a 70% (v/v), até que se apresentaram sem sujidades aparentes. As amostras de leite foram obtidas em duplicatas, em tubos de ensaio esterilizados, antes do início da ordenha.

As amostras de leite para CCS foram colhidas por meio de medidores de leite após a ordenha completa dos animais, nos mesmos dias das colheitas para as análises microbiológicas. A CCS foi determinada por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount 300 (Bentley, 1995). Para tanto, após as coletas das amostras, o leite foi acondicionado em frasco plástico com capacidade para 60 mL, com a adição de duas pastilhas de bronopol. As amostras foram enviadas a 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 aferições da produção de leite dos animais foram efetuadas por ordenhadores treinados, sempre no dia seguinte após a realização das

colheitas para os exames microbiológicos e CCS, nas ordenhas da manhã e da tarde, para evitar possíveis interferências na produção total do animal devido à presença de pessoas estranhas à ordenha.

A escolha dos princípios ativos homeopáticos para o tratamento realizado foi baseada em assessoria técnica especializada na área de homeopatia, que auxiliou por meio do acompanhamento da elaboração das formulações homeopáticas e orientação de seu fornecimento aos animais. Os princípios ativos *Beladonna* (12 CH), *Hepar sulphur* (12 CH), *Silicea* (12 CH), *Phosphorus* (12 CH) e *Phytolacca* (12 CH) do composto homeopático foram acrescentados à alimentação das vacas em lactação, conforme a orientação técnica, por um período de 12 meses. O técnico da área de homeopatia orientou as quantidades e os princípios ativos escolhidos, baseando as dinamizações no histórico anterior da etiologia infecciosa da mastite antes do início do tratamento homeopático.

Exames laboratoriais

- Identificação das bactérias do gênero *Staphylococcus* spp.

As amostras de leite foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia, localizado na Embrapa Pecuária Sudeste, após o acondicionamento em caixas de material isotérmico (isopor) com cubos de gelo. A identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. foi realizada a partir da semeadura de 10 µL de leite sobre a superfície de placas de Petri, contendo ágar sangue, incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. Transcorrido este período, as colônias foram avaliadas quanto às suas características macroscópicas e coloração pelo método de Gram. Os cocos Gram-positivos foram submetidos às provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho. 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* (Koneman et al., 2001). Já as coagulase-negativas foram submetidas aos testes de sensibilidade à furazolidona e de oxidase para a diferenciação entre as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (Holt et al., 1994; Almeida et al., 2005).

Extração do DNA e identificação de *Staphylococcus* spp.

Três a cinco colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp. foram transferidas para tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), com posterior incubação a 37 °C por 18 horas, em estufa. O protocolo de Kuramae-Izioka (1997) foi utilizado para as extrações de DNA. Para isso, 1,0 mL do cultivo bacteriano foi transferido para tubos eppendorf com capacidade para 2,0 mL. Os tubos foram centrifugados a 13.400 x g, por dois minutos e o pellet de células ressuscitado em 700 µL de tampão de extração [Tris-HCl 160 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 20 mM e SDS 0,5% (p/v)], homogeneizados e mantidos em banho-maria a 65 °C, por 40 minutos, agitados a cada 15 minutos. Foram acrescentados 300 µL de acetato de potássio 5 M, homogeneizado e incubado em banho de gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 15 minutos. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram retiradas do gelo e acrescentou-se 650 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico, na concentração de 24:1:10.

A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e novamente centrifugada a 13.400 x g, por 10 minutos a 10 °C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos. Em seguida, o DNA foi precipitado por adição de 1.000 µL de etanol absoluto gelado. A solução foi misturada e mantida em freezer a -20 °C overnight para a precipitação do DNA em etanol. Os tubos foram centrifugados a 13.400 x g, por 17 minutos, a 10 °C. Descartada a fase líquida, o pellet foi lavado com 1.000 µL de etanol 70% (v/v).

Após a realização de uma segunda centrifugação, a 13.400 x g por 10 minutos a 10 °C, a fase líquida foi novamente descartada e o pellet mantido para secar em estufa a 50 °C. Após secagem, o DNA genômico foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). A qualidade e quantidade de DNA foram avaliadas por espectrofotometria de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Os valores referentes à qualidade do DNA no intervalo de 1,8 a 2,0 foram considerados como de boa qualidade (Sambrook; Russel, 2001).

As reações para PCR para a identificação de *Staphylococcus* spp. foram originadas de um volume final de 20 µL, dos quais 50 mM MgCl₂, 100 mM de dnTP, 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador, descrito por por Martineau et al. (2001) (Tabela 1), 5U de Taq polimerase e 50 ng de DNA molde. As reações tiveram um ciclo a 95 °C por três minutos, seguindo 30 ciclos de amplificação que consistiu na desnaturação a 94 °C por um minuto, pareamento a 55 °C por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto, com uma extensão final de 72 °C por sete minutos em um termociclador (*Mastercycler gradient*, *Eppendorf*). A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 1% de gel de agarose, corado com SYBR Safe e um marcador de tamanho 100 pb (Invitrogen, Brasil).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores para a identificação de *Staphylococcus* spp.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado (pb)
<i>TStag</i>	GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC	370
	TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA	

- Teste de susceptibilidade antimicrobiana in vitro

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados em placas de ágar Müller-Hinton, por meio da técnica de disco-difusão a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). Os princípios ativos utilizados foram: Penicilina/Benzilpenicilina (10 µg), Gentamicina (10 µg), Enrofloxacin (5 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Norfloxacina (10 µg), Eritromicina (15 µg), Nitrofurantóina (300 µg), Tetraciclina (30 µg), Doxiciclina (30 µg), Sulfazotrim (25 µg), Oxacilina (1 µg), Cefalexina (30 µg) e Sulfametoxazol/Trimetoprim (25 µg).

- Identificação de genes de resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos

A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme exposto anteriormente. As reações para PCR para a identificação dos genes de resistência originaram-se de um volume final de 20 µL, dos quais 50 mM MgCl₂, 100 mM de dnTP, 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador, descrito por Mehrotra et al. (2000) para o gene *mecA* e Duran et al. (2012) para o gene *blaZ* (Tabela 2), 5U de Taq polimerase e 50 ng de DNA molde. As reações seguiram um ciclo a 95 °C por três minutos, seguindo 30 ciclos de amplificação que consistiram na desnaturação a 94 °C por um minuto, pareamento a 55 °C por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto, com uma extensão final de 72 °C por sete minutos em um termociclador (*Mastercycler gradient*, *Eppendorf*). A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 1% de gel de agarose, corado com SYBR Safe e um marcador de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores para a identificação dos genes *blaZ* e *mecA* em *Staphylococcus* spp.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado (pb)
<i>BlaZ</i>	GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC	173
	GACCACTTTTATCAGCAACC	
<i>mecA</i>	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163

- Análises dos resultados

As mudanças nos padrões de resistência antimicrobiana no período de tempo estudado foram analisadas por meio do teste de Qui-Quadrado (Cuevas et al., 2004). A frequência de casos de mastite causada por *Staphylococcus* spp. foi obtida pelo coeficiente de morbidade prevalente, expresso pelo número de casos da doença existente no momento e nos locais de realização do trabalho relacionados com as populações existentes naqueles determinados momentos e locais (Costa; Kale, 2002), conforme fórmula a seguir.

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos da doença existente no localcx em um dado momento}}{\text{População existente naquele momento e local}} \times 100$$

Resultados e discussão

A Tabela 3 apresenta os resultados relacionados ao CMT durante e após o tratamento homeopático.

Tabela 3. Resultados do *California Mastitis Test* (CMT) de amostras analisadas de vacas submetidas ao tratamento homeopático e em vacas após a realização do tratamento homeopático para mastite subclínica.

Resultados	Durante tratamento	Após tratamento
Um quarto positivo	136 (21,5%)	44 (20,0%)
Dois quartos positivos	56 (8,9%)	31 (14,0%)
Três quartos positivos	11 (1,7%)	20 (9,0%)
Quatro quartos positivos	11 (1,7%)	30 (13,6%)
Quartos negativos	418 (66,1%)	96 (43,4%)
Total	632 (100%)	221 (100%)

Em ambos os períodos, houve predominância de quartos mamários não reagentes ao CMT, quando analisadas as reações positivas ao teste separadamente. Entretanto, quando consideradas todas as reações ao CMT em conjunto, após o tratamento predominaram quartos positivos ao teste. Quando as vacas apresentaram reações positivas ao CMT, a maioria apresentou positividade em somente um quarto mamário. No segundo período da pesquisa, ou seja, quando o tratamento homeopático não mais era realizado, observou-se percentuais superiores de vacas com reações positivas em três e quatro quartos mamários.

O CMT analisa indiretamente a quantidade de células somáticas do leite e, desde que corretamente implantado e interpretado, apresenta-se como uma ferramenta de importância para o diagnóstico da mastite subclínica. O teste é de baixo custo, entretanto pode ser subjetivo de acordo com o indivíduo responsável pelas leituras (Massote et al. 2019). Túlio et al. (2018) analisaram índices de mastite subclínica em rebanhos no município de Nova Prata do Iguazu, PR e detectaram 41,9% de animais positivos ao CMT em uma ou mais glândulas mamárias. Dentre os animais que apresentaram mastite subclínica, a maior ocorrência foi em uma (73,3%) e duas (17,8%) glândulas mamárias afetadas.

Diferentemente, Santos et al. (2020) observaram que em 20,6% de amostras analisadas detectou-se mastite subclínica, cujas maiores ocorrências foram de escores dois (35,1%) e três (46,5%).

A Tabela 4 traz a etiologia infecciosa da mastite em vacas sob tratamento homeopático e em período posterior, quando o tratamento não mais era realizado. No primeiro período, com as vacas em tratamento, parte dos animais serviu de controle negativo (Animais não tratados). Os resultados estão disponibilizados a seguir, na Tabela 4.

Nas vacas em tratamento homeopático, *Corynebacterium* spp. foram os micro-organismos de maior ocorrência, seguidos por *Streptococcus* spp. e *S. aureus*. Quando o tratamento com homeopatia não estava sendo realizado no rebanho, *Streptococcus* spp. foram os micro-organismos prevalentes. Porém, ao considerar todas as espécies isoladas, *Staphylococcus* spp. foi o gênero bacteriano de maior ocorrência no rebanho em ambos os períodos. A relevância desses micro-organismos na etiologia infecciosa da mastite, clínica ou subclínica, já foi relatada por outros autores, assim como as consequências negativas sobre a qualidade e a produção de leite (Qu et al., 2019; Rasooly et al., 2020).

Tabela 4. Ocorrência de microrganismos isolados no leite de vacas quando parte do rebanho foi submetido à homeopatia (animais tratados e não tratados) e em leite de animais quando todo o rebanho não estava em tratamento (animais após o tratamento).

Microrganismos	Animais tratados	Animais não tratados	Animais após o tratamento
<i>Corynebacterium</i> spp.	21 (19,3%)	19 (16,2%)	- (0%)
<i>Streptococcus</i> spp.	13 (12,0%)	20 (17,0%)	20 (14,3%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (12,0%)	11 (9,4%)	11 (7,9%)
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	11 (10,0%)	7 (6,0%)	1 (0,7%)
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	5 (4,6%)	3 (2,6%)	2 (1,4%)
Leveduras	1 (0,9%)	- (0%)	1 (0,7%)
Negativo	45 (41,2%)	57 (48,8%)	105 (75,0%)
Total	109 (100%)	117 (100%)	140 (100%)

Segundo Damasceno et al. (2020), ao analisarem amostras de leite de uma fazenda no Sul de Minas Gerais, *S. aureus* e *Streptococcus* spp. estão entre os principais agentes bacterianos envolvidos em casos de mastite clínica e subclínica. Diferentemente, Oliveira et al. (2020) analisaram amostras de leite de uma propriedade em Mossoró, RN, e relataram como principais agentes etiológicos *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp., identificados em 85% das amostras, justificando a elevada frequência de *Bacillus* spp. devido a práticas de manejo, higiene e terapêuticas inadequadas.

No estudo realizado por Soares (2021) encontrou-se como agentes etiológicos de maior prevalência *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. Dal Vesco et al. (2017) relataram que 44% dos isolados em amostras de vacas com mastite foram apontados como

Staphylococcus coagulase negativa (SCN), 26% como *Staphylococcus coagulase* positiva (SCP) e 10% eram bactérias do gênero *Streptococcus* spp.

Silva (2023) analisou a incidência da mastite clínica e subclínica em uma propriedade rural e identificou como principais agentes da mastite subclínica SCN (59,06%) e *Streptococcus uberis* (13,98%). Motta (2015), em um estudo sobre a eficácia do ceftiofur no tratamento estendido intramamário da mastite subclínica causada por estafilococos, isolou 45 linhagens de *Staphylococcus* spp.

A Tabela 5 apresenta os valores médios de produção de leite e a CCS do leite em vacas em que somente *Staphylococcus* spp. foram isolados, durante o uso da homeopatia e posteriormente ao uso da homeopatia.

Tabela 5. Médias dos valores da produção de leite (em litros) e contagem de células somáticas (células/mL) em amostras com e sem isolamento de *Staphylococcus* spp. no leite de vacas durante o tratamento da mastite com homeopatia e após o tratamento homeopático.

Microrganismos	Durante tratamento		Após tratamento	
	Produção de leite	CCS	Produção de leite	CCS
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	23,3	531.000	16,9	215.000
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,5	649.000	21,5	519.000
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	22,4	340.000	26,0	154.000
Vacas sadias	23,2	281.000	24,5	155.000

As informações apresentadas na tabela anterior são descritivas, sem o intuito de comparação dos resultados. Nota-se, porém, a menor produção média de quartos mamários de vacas infectadas por *S. aureus* durante o período de tratamento homeopático. Mesmo em quartos mamários saudáveis, a CCS média foi acima do valor médio comumente considerado como normal para quartos sem mastite, igual a 200 mil células/mL de leite. Além da mastite, outros fatores podem interferir na CCS acarretando aumento de valores, como paridade e estágio de lactação, por exemplo (Teixeira et al., 2003). No período em que os animais não estavam sob tratamento homeopático, o leite de vacas saudáveis apresentou CCS média de 155 mil células/mL, enquanto a CCS média em vacas acometidas por *S. aureus* foi de 519 mil células/mL.

Vaso et al. (2018), em estudo com SCN isolados em leite de vacas tratadas com homeopatia, relataram que os animais infectados por

Staphylococcus xylosus apresentaram CCS mais elevada, próxima a 5000×10^3 células/mL, enquanto em vacas infectadas por *Staphylococcus warneri*, o valor médio da CCS foi de 290×10^3 células/mL. Assim, a CCS média do leite de quartos infectados por SCN pode estar semelhante à de quartos saudáveis por estar relacionada com a dinâmica de infecção por diferentes espécies dessas bactérias em distintos momentos no rebanho.

Staphylococcus spp. podem ser resistentes a vários antimicrobianos, dificultando os tratamentos de vacas com mastite. Adicionalmente, o conhecimento dos perfis de resistência antimicrobiana desses micro-organismos pode ajudar no acompanhamento da epidemiologia da doença. A Tabela 6 apresenta os perfis de suscetibilidade in vitro a diferentes princípios ativos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp., isolados do leite das vacas que estavam recebendo tratamento homeopático.

Tabela 6. Suscetibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas tratadas com homeopatia.

Princípios ativos	<i>S. aureus</i> (n)			<i>S. epidermidis</i> (n)			<i>S. chromogenes</i> (n)		
	S	SI	R	S	SI	R	S	SI	R
Sulfazotrim	0	0	26	0	0	13	1	0	18
Penicilina	16	0	10	7	0	6	18	0	1
Tetraciclina	16	1	9	7	1	5	19	0	0
Gentamicina	18	1	7	10	2	1	19	0	0
Doxiciclina	17	7	2	7	1	5	19	0	0
Ciprofloxacina	24	2	0	13	0	0	19	0	0
Eritromicina	24	2	0	5	0	8	19	0	0
Cefalexina	25	0	1	13	0	0	18	0	1
Oxacilina	25	0	1	9	0	4	18	0	1
Enrofloxacina	28	1	0	13	0	0	19	0	0
Norfloxacina	26	0	0	13	0	0	19	0	0
Nitrofurantoína	26	0	0	13	0	0	19	0	0

Sensível (S); Sensibilidade intermediária (SI); Resistente (R).

A Tabela a seguir apresenta *Staphylococcus* spp. investigados durante o período sem tratamento com homeopatia e seus respectivos perfis de suscetibilidade in vitro aos antimicrobianos.

Tabela 7. Suscetibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas que não estavam submetidas à homeopatia.

Princípios ativos	<i>S. aureus</i>			SCN			SCP		
	S	SI	R	S	SI	R	S	SI	R
Doxiciclina	9	0	3	1	0	0	2	0	0
Sulfazotrim	9	0	3	0	0	1	1	0	1
Penicilina	10	0	2	0	0	1	1	0	1
Tetraciclina	9	1	2	1	0	0	2	0	0
Nitrofurantoína	11	0	1	1	0	0	2	0	0
Cefoxitina	12	0	0	1	0	0	2	0	0
Cefalexina	12	0	0	1	0	0	2	0	0
Norfloxacina	11	1	0	1	0	0	2	0	0
Ciprofloxacina	11	1	0	1	0	0	2	0	0
Oxacilina	11	1	0	1	0	0	2	0	0
Gentamicina	11	1	0	1	0	0	2	0	0
Enrofloxacina	11	1	0	1	0	0	2	0	0
Eritromicina	7	5	0	1	0	0	2	0	0

Sensível (S); Sensibilidade intermediária (SI); Resistente (R); *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN); *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP).

Os resultados referentes ao período em que o rebanho estava sendo submetido à homeopatia (Tabela 6) estão relacionados a três espécies mais prevalentes na etiologia da mastite naquele período. Isolados identificados como *S. aureus* apresentaram amostras resistentes ao sulfazotrim, à penicilina, tetraciclina, gentamicina. Algumas amostras foram resistentes à cefalexina, oxacilina e doxiciclina. Os isolados identificados como *Staphylococcus epidermidis* tiveram padrão de resistência semelhante ao *S. aureus*, diferenciando-se por não apresentar resistência antimicrobiana à cefalexina, enquanto algumas amostras foram resistentes à eritromicina. No período em que as vacas não estavam sendo tratadas com homeopatia (Tabela 7), apesar das espécies de SCN não terem sido identificadas, observou-se uma menor gama de princípios ativos aos quais os micro-organismos apresentaram resistência in vitro, quando comparado com o período em tratamento.

Kurosawa et al. (2020), ao analisarem o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp., relataram resultados semelhantes ao do presente trabalho com percentuais de resistência à penicilina (34,5%), oxacilina (26,7%) tetraciclina (13,8%)

e eritromicina (17,2%), enquanto a gentamicina apresentou maior sensibilidade (96,5%). Pinto et al. (2021), ao analisarem a prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista, identificaram que *S. aureus* expressou maior resistência a Penicilina G (87,5%) e ao Sulfazotrim (28,6%) e à tetraciclina (28,6%).

As possíveis mudanças nos padrões de resistência antimicrobiana entre os dois períodos foram analisadas durante e após o tratamento com homeopatia. Os testes foram realizados para os princípios ativos doxiciclina, penicilina e tetraciclina, não sendo possível a análise para os demais princípios ativos devido à quantidade insuficiente de micro-organismos com resistência antimicrobiana in vitro. Não houve diferença nos perfis de suscetibilidade a esses três princípios ativos antimicrobianos entre os períodos em que a homeopatia foi utilizada no rebanho e aquele em que não foi usada para o controle da mastite bovina ($P > 0,05$).

Os genes relacionados com resistência antimicrobiana nas espécies de *Staphylococcus* spp. foram investigados (Tabela 8).

Tabela 8. Ocorrência de genes relacionados com resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas com e sem tratamento homeopático.

Espécie	Com tratamento homeopático		Sem tratamento homeopático	
	Gene <i>blaZ</i>	Gene <i>mecA</i>	Gene <i>blaZ</i>	Gene <i>mecA</i>
<i>S. aureus</i>	32 (53,3%)	- (0,0%)	2 (66,6%)	- (0,0%)
<i>S. epidermidis</i>	14 (23,3%)	12 (100,0%)	- (0,0%)	- (0,0%)
<i>S. chromogenes</i>	14 (23,3%)	- (0,0%)	- (0,0%)	- (0,0%)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	- (0,0%)	- (0,0%)	1 (33,3%)	- (0,0%)
Total	60	12	3	0

Conforme resultados apresentados na tabela anterior denota-se a presença de microorganismos com potencial de resistência antimicrobiana, mesmo em período com suposto menor uso de antimicrobianos convencionais, ou seja, durante o tratamento homeopático. Em estudo anterior, Awad et al. (2017) observaram a presença do gene *blaZ* e *mecA* em *S. aureus* resistentes à penicilina e a outros princípios ativos antimicrobianos. Jamili; Radmerh; Ismail (2014) também relataram que *S. aureus* resistentes à penicilina, gentamicina e oxacilina apresentaram os genes *blaZ*, *mecA*, além do *aacA-aphD*.

Martin (2015), em estudo com estirpes de *Staphylococcus aureus*, identificou 88 amostras positivas para gene *blaZ*, 70 das quais resistentes à penicilina. Angol et al. (2013) também descreveram *Staphylococcus* spp. positivos para *blaZ*, enquanto nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Além de espécies coagulase-positivas, o gene *blaZ* pode ser identificado em espécies coagulase-negativas, como *Staphylococcus epidermidis*, por exemplo (Vieira, 2017).

A Tabela 9 apresenta a prevalência de mastite acometida por *Staphylococcus* spp. nos meses em que as amostras foram obtidas durante o período de tratamento e posterior ao tratamento homeopático.

Tabela 9. Prevalências mensais de mastite subclínica causada por *Staphylococcus* spp. em vacas tratadas com homeopatia, durante 12 meses, e sem tratamento homeopático em um período de 7 meses.

Ordem das coletas	Com tratamento homeopático	Após tratamento homeopático
1	11,8%	13,0%
2	24,0%	8,0%
3	10,9%	5,9%
4	11,9%	14,3%
5	24,4%	15,0%
6	12,5%	9,5%
7	20,0%	11,1%
8	16,1%	-
9	17,0%	-
10	14,0%	-
11	15,2%	-
12	22,2%	-

As prevalências mensais de mastite subclínica estafilocócica no período do tratamento com homeopatia variaram de 10,9% a 24,4%, enquanto no período em que os animais não estavam em tratamento homeopático houve uma variação de 5,9% a 15,0%. Ventura; Stilwell (2021) relataram prevalência de 49,8% de mastite causada por agentes etiológicos contagiosos, sendo que a maior ocorrência foi de *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* spp. Vários são os fatores que podem afetar a prevalência dos agentes etiológicos na etiologia da doença. Por exemplo, o tipo de manejo com que cada rebanho é mantido e que pode propiciar uma maior ocorrência de agentes contagiosos ou ambientais (Rohling; Rangrab, 2021).

Almeida et al. (2023) relatou discreta redução da prevalência da mastite após 59 dias de tratamento com homeopatia, contrariamente ao observado, quando mensalmente as prevalências foram calculadas durante 12 meses. Segundo Ferreira et al. (2022), a presença de genes ligados a fatores de patogenicidade combinados com a persistência de perfis clonais de *Staphylococcus* spp. em rebanho tratado com homeopatia, demonstra que outras formas de controle para mastite bovina deveriam ser pesquisadas para rebanhos com manejo de produção orgânica de leite.

Conclusões

- 1) Existe a potencial presença de resistência antimicrobiana in vitro em ambos os períodos investigados, seja durante o tratamento homeopático, seja em período sem este tipo de tratamento, o que denota a possibilidade de *Staphylococcus* spp. continuarem a se apresentar como problemas de saúde pública, mesmo em rebanhos sob manejo orgânico. As prevalências mensais da mastite causada por *Staphylococcus* spp. indicam que o tratamento homeopático não controla esses micro-organismos e que eles permanecem no rebanho.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), nº do processo 2020/09470-3.

Referências

- AGNOL, A. M. D.; CAVALCANTE, M. B.; FRANÇA, C. A. de F.; KREWER, C. da C.; QUEIROS, A. A. de; COSTA, M. M. da; BRAGANÇA, J. F. M.; GIRARDINI, L. K. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 311-322, jan./fev. 2013. Disponível em: DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p311.
- ALMEIDA, A. J. O.; FONSECA, M. I.; ALMEIDA, L. A. DO B.; SARQUES, R. P. Avaliação da eficácia de medicamento homeopático BioBoi® na incidência e prevalência de mastite subclínica em vacas leiteiras. **Pubvet**, v. 17, n. 3, mar. 2023. DOI: 10.31533/pubvet.v17n03a1353.
- ALMEIDA, L. A. DO B.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PIRES, M. DE F. Â.; 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, jan.-mar. 2005. DOI: 10.1590/1808-1657v72p0012005.
- ALVES, T.; MOREIRA, M. A. S. Mastite bovina: tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **Uniciências**, v. 25, n. 1, 2021. DOI: 10.17921/1415-5141.2021v25n1p20-25.
- AWAD, A.; RAMANDAN, H.; NARS, S.; ATEYA, A.; ATWA, S. Genetic characterization, antimicrobial resistance patterns and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**: PJBS, v. 20, n. 6, p. 298-305, 2017. DOI: 10.3923/pjbs.2017.298.305.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Somacount 300**: operator's manual. Chaska: Bentley, 1995. 12 p.
- 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. Circular Técnica, 55).
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. M100S. 26th ed. Wayne: CLSI, 2016. v. 36, n. 1.
- CONRAD, L. F. **Mastite bovina por *Staphylococcus aureus***. 2014. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/108155>.

- COSTA, S. B. C. DE. **Uso da homeopatia como opção terapêutica no pós-cirúrgico em medicina veterinária**. 2015. 58 f. Trabalho Conclusão de Curso (Especialista em Homeopatia) - Centro Alpha de Ensino, Associação Paulista de Homeopatia. 2015. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/hom-11034>.
- COSTA, A. J. L.; KALE, P. L. Medidas de frequência de doença. In: MEDRONHO, R. A.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 15-31.
- COSTA FILHO, L. C. C. DA; QUEIROZ, V. L. D.; SOUZA, M. F. DE A.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. DA C. Homeopatia aplicada à reprodução animal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 63-68. jan./mar. 2014.
- CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; VINDEL, A.; GUINEA, J.; SÁNCHEZ-CONDE, M.; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M.; BOUZA, E.; THE SPANISH GROUP FOR THE STUDY OF STAPHYLOCOCCUS. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4240-4245, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4240-4245.2004.
- DAMASCENO, V. S.; SILVA, F. M.; SANTOS, H. C. DE A. S. DOS. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda no Sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 91409-91421, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n11-522.
- DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; FERREIRA JUNIOR, R. S. Manejo sanitário animal. Rio de Janeiro: **Publicações Biomédicas**, 2001. 210 p.
- DURAN, N.; OZER, B.; DURAN, G. G.; ONLEN, Y.; DEMIR, C. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 3, p.389–396, mar. 2012.
- FERREIRA, E. M.; ROMERO, L. C.; CUNHA, M. DE L. R. DE S. DA; MALAGO JUNIOR, W.; CAMARGO, C. H.; BARIONI JUNIOR, W.; ZAFALON, L. F. Persistence of *Staphylococcus* spp. in milk from cows undergoing homeopathy to control subclinical mastitis. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 273, 2022. 13 p. DOI: 10.1186/s12917-022-03364-8.
- FONSECA, M. E. B. DA; MOURÃO, A. M.; CHAGAS, J. D. R.; ÁVILA, L. M.; MARQUES, T. L. P.; BAËTA, B. DE A.; MORAES, R. F. F. DE; ROIER, E. C. R.; Mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 2, a.743, p. 1-18, fev. 2021. DOI: 10.31533/pubvet.v15n02a743.1-18.
- HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3 ed. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual® of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- JAMILI, H.; RADMERH, B.; ISMAIL, S. Comunicação curta: prevalência e resistência a antibióticos de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite clínica bovina. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2226-2230, apr. 2014. DOI: 10.3168/jds.2013-7509.
- JESUS, R.; COUTINHO, C. A. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 12, n. 3, mar. 2018. DOI: 10.22256/pubvet.v12n3a58.1-10%20%20.
- 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.
- KOT, B.; SZWEDA, P.; FRANKOWSKA-MACIEJEWSKA, A.; PIECHOTA, M.; WOLSKA, K. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 2, p.228–235, apr. 2016. DOI: 10.1017/S002202991600008X.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar**, v. 19, n.3, p. 683–689, 1997.
- KUROSAWA, L. S.; CÉZAR, L. M. L.; MARQUES, F. A.; ORIANI, M. R. DE G.; MORAES, M. E. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, v. 14, n. 5, a563, p. 1-6, maio 2020. DOI: 10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6.
- MARTIN, C. L. **Caracterização da resistência fenotípica e molecular à penicilina e tetraciclina em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade de Santa Catarina, 2015. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2429176.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; KE, D.; PARADIS, S.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for identification of *Staphylococci* at genus and species levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2541-2547, july 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2541-2547.2001.

MASSOTE, V. P.; ZANATELI, B. M.; ALVEZ, G. V.; GONÇALVES, E. S.; GUEDES, E. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019. Disponível em: <https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/265/243>.

MEHROTRA, M.; WANG G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1032-1035.2000.

MELO, L. J. U. N. DE. **Mastite em rebanhos bovinos: revisão de literatura**. 2020. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) – Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, Repositório Institucional do Instituto Federal Goiano, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/1525>.

MOTTA, R. G. **Eficácia do ceftiofur no tratamento estendido intramamário da mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas**. 2015. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/140263>.

OLIVEIRA, P. V. C. DE; LIMA NETO, E. DE S. L.; LUCENA, N. M.; ABRANTES, M. R.; SILVA, J. B. A. DA; AZEVEDO NETO, C. O. DE; LUZ, K. S. DA S.; MEDEIROS, D. A. S. Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró - RN. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 64027-64042, aug. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-728.

PINTO, M. DOS S.; FUZZATI, J. V. S.; CAMARGO, R. C.; SILVA, R. A. B.; GARCIA, M. DA S.; FRIAS, D. F. R. Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 19184-19192, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-525.

QU, Q.; WANG, J.; CUI, W.; ZHOU, Y.; XING, X.; CHE, R.; LIU, X.; CHEN, X.; BELLO-ONAGHISE, G.; DONG, C.; LI, Z.; LI, X.; LI, Y. In vitro activity and In vivo efficacy of isoliquiritigenin against *Staphylococcus xylosum* ATCC 700404 by IGPD target. **Plos One**, v. 14, n. 12, p. 1-20, dez. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0226260.

RASOOLY, R.; MOLNAR, A.; DO, P.; MORRONI, G.; BRESCINI, L.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; APOSTOLIDIS, E. Witch hazel significantly improves the efficacy of commercially available teat dips. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 1-16, feb. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020092.

ROHLING, M.; RANGRAB, L. H. Avaliação da qualidade do leite e prevalência de agentes bacterianos em mastite de vacas leiteiras em diferentes sistemas de produção na bacia leiteira de Braço do Norte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária da FAEF**. In: Repositório Universitário de Anima (RUNA). 2021. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/13814>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, A. S.; MENDONÇA, T. O.; MUNIZ, I. M. Prevalência de mastite bovina em rebanhos leiteiros no Município de Rolim de Moura e adjacências, Rondônia. **Pubvet**, v. 14, n. 6, a595, p. 1-6, jun. 2020. DOI: 10.31533/pubvet.v14n6a595.1-6.

TÚLIO, L. M.; SILVA, E. B. Índice de mastite subclínica no rebanho leiteiro do município de Nova Prata do Iguape/PR. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 1, n. 1, 2018. Disponível em: <http://themaetscientia.fag.edu.br/index.php/ABMVFAG/article/view/260>.

SILVA, L. A. DA. **Incidência de mastite clínica e subclínica em uma propriedade rural: agentes etiológicos e sazonalidade**. 2023. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/37294>.

SOARES, L. A. P. **Implicações no diagnóstico da mastite subclínica bovina de vacas em lactação coinfectadas por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus***. 2021. 72 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária, Clínica e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/handle/1/23394>.

TEIXEIRA, N. M.; FREITAS, A. F.; BARRA, R. B. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, ago. 2003. DOI: 10.1590/S0102-09352003000400016.

THÄNERT, R.; GOLDMANN, O.; BEINEKE, A.; MEDINA, E. Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during in vivo infection. **Nature Communications**, v. 8, 14268, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14268.

VASO, C. O.; SEIXAS, A. B.; ALVES, T. C.; ZAFALON, L. F. Staphylococcus coagulase-negativos no leite de vacas com mastite tratadas com composto homeopático. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., 2017. **Anais...** São Carlos: UNICEP, 2018. p. 5.

VENTURA, J. A. F.; STILWELL, G. T. **Estudo retrospectivo sobre a prevalência dos agentes etiológicos de mastites e sua sensibilidade aos antibióticos na Ilha de São Miguel.** 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 2021. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/21248>.

DAL VESCO, J.; SIEBEL, J. C.; SUZIN, G. O.; CERESER, N. D.; GONZALEZ, H. DE L. Monitoramento dos agentes causadores de mastite e a susceptibilidade aos antimicrobianos. **Expressa Extensão**, v. 22, n. 1, 2017. DOI: 10.15210/ee.v22i1.7886.

VIEIRA, T. R. **Pesquisa de Staphylococcus spp. coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à metilina.** 2017. Repositório Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/158043>.