

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante para  
controle da mastite**

**Fernando da Silva Bandeira**

Pelotas, 2015

**Fernando da Silva Bandeira**

**Bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante para controle da mastite**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Coorientadores: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dr. João Luiz Zani

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B214b Bandeira, Fernando da Silva

Bacterina de staphylococcus aureus contendo própolis como adjuvante para controle da mastite / Fernando da Silva Bandeira ; Geferson Fischer, orientador ; Fábio Pereira Leivas Leite, João Luiz Zani, coorientadores. — Pelotas, 2015.

112 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Vacina. 2. Imunidade. 3. ELISA. 4. qPCR. 5. CXCR-5. I. Fischer, Geferson, orient. II. Leite, Fábio Pereira Leivas, coorient. III. Zani, João Luiz, coorient. IV. Título.

CDD : 636.214

Fernando da Silva Bandeira

Bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante para controle da mastite

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)  
Pós-Doutor em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Pós-Doutor em Ciências Agrárias pela University of Idaho-Moscow.

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva  
Doutor em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenice Gonzalez de Lima  
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico esse trabalho a todos aqueles a quem não pude dar a atenção que mereciam: sejam alunos, colegas, amigos ou familiares e mesmo assim souberam entender... Dedico também, e principalmente, a todas as pessoas que não mediram esforços para colaborar...**

## **Agradecimentos**

A Universidade Federal de Pelotas, particularmente a Faculdade de Veterinária, por ser a minha casa em um relacionamento que já dura quase 17 anos e está apenas no início...

Aos meus pais e minha companheira Daniella, por estarem presentes nos grandes momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Geferson Fischer, pela confiança, seriedade, ensinamentos e sua grande amizade, acima de tudo.

Ao meu comitê de orientação, prof. Dr. Fábio Leivas Leite, quem conheci nessa jornada, mas esteve sempre disposto a auxiliar sem nunca medir esforços em transmitir seus conhecimentos. Ao prof. Dr. João Luiz Zani, que além das valiosas informações que fizeram parte do sucesso desse momento, sempre demonstrou uma enorme amizade e, principalmente, por ser um dos responsáveis pela minha transferência, que entre outras coisas me possibilitou a realização do doutorado.

Ao prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, responsável por contribuições valiosas desde o início de minha trajetória na vida acadêmica e que sempre esteve presente, seja fornecendo um isolado bacteriano que foi fundamental para o sucesso dos testes imunoenzimáticos, seja por esclarecer dúvidas, seja pelos momentos em que a sua experiência ajudou a nortear os caminhos de minha vida profissional.

A prof<sup>a</sup> Dra Helenice de Lima Gonzales, pelos seus valiosos conhecimentos sobre a produção animal e qualidade do leite, além do “empréstimo” de soro sanguíneo de vacas com mastite, fundamentais para adequação de algumas de nossas técnicas.

A prof<sup>a</sup> Fernanda Rezende Pinto, além de minha colega de profissão, foi a responsável por não só manter as disciplinas que ministramos, mas pelo salto de qualidade que estamos conseguindo imprimir em nossas atividades docentes.

Aos professores Marcelo e Sílvia, do LABVIR, contribuindo sempre com idéias e sugestões que elevaram o nível da tese. Ao prof. Éverton Fagonde da Silva, e ao amigo Samuel Félix pelas nossas conversas técnicas despretensiosas que me permitiram encontrar alternativas quando os caminhos pareciam bem mais tortuosos. Ao prof. Schuch, onde várias dúvidas foram sanadas e, junto com suas orientadas, agradeço por dividirem o laboratório comigo.

Ao prof. Niraldo, pelas instruções sobre como entender o própolis, e a prof<sup>a</sup> Amarilis por me ensinarem que trabalhar com a própolis é mais do que uma técnica: é um arte.

A todos os colegas de tantos laboratórios pelos quais passei, sejam na veterinária, no CDTec, no biotério, na botânica, na farmacologia da UFSC, enfim. Particularmente aos amigos Toni, Cris e Raulene, por estarem sempre perto, ajudando e aturarem minhas trapalhadas e atacações. Ao Itauá, Dênis, Mateus. Rodrigo, Cacá, Dedé, Aline, Anelise, Patrícia, Débora, *Márcias*... A dona Márcia, Lídio, Gancho, a Leca, ao Zeca e ao “Seu” Paulo, por suas palavras de incentivo a realização de um doutorado.

A todos aqueles que esqueci momentaneamente...

*Ninguém nos disse quem éramos...  
Ninguém nos disse o que deveríamos tentar...  
Ninguém nos disse que seria fácil.  
Alguém disse:  
Que somos nossos sonhos,  
Que se não sonhamos, estamos mortos...  
Nossos passos seguem o instinto que nos leva ao desconhecido,  
Nós não olhamos os obstáculos superados:  
E sim aqueles que ainda vamos superar.  
Kilian Jornet*

## Resumo

BANDEIRA, Fernando da Silva. **Bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante para controle da mastite**. 2015. 112f. . Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A mastite bovina é um problema sanitário mundial, com medidas de tratamento e prevenção insatisfatórias. Paralelamente, vem crescendo o interesse no uso de própolis como alternativa para tratamento das mastites, sendo ainda, objeto de estudos com finalidade de uso como adjuvante. Até o momento, porém, não foi descrito seu uso em vacinas para controle da mastite bovina. A importância do gênero *Staphylococcus* como agente da enfermidade é bem documentada, crescendo a necessidade de identificação da espécie do agente etiológico. A pesquisa identificou 12,6% de estafilococos coagulase positiva em mastites subclínicas na região sul do Brasil, sendo que *S. aureus* estando presente em 17,6% dos animais pesquisados. Dentre os isolados coagulase positiva, a frequência de *S. aureus* foi de 85,7%, a de *S. intermedius* foi de 8,5% e de *S. hyicus* foi 5,8%. A bactéria *S. aureus* utiliza vários fatores de patogenicidade para causar a infecção no hospedeiro. Foi pesquisado em bases de dados, as informações recentes sobre os principais produtos expressos e forma de atuação. Descreveu-se os principais mecanismos ligados a penetração do micro-organismo na glândula mamária, os processos que medeiam a formação do biofilme e suas estratégias de sobrevivência as respostas do hospedeiro, resultando em processos que muitas vezes tornam-se crônicos. Finalmente, é desejável a utilização de uma vacina eficiente para colaborar no controle da mastite, e dessa forma foi proposta a utilização de uma bacterina contendo extrato hidro-alcoólico de própolis verde na formulação. Comparou-se o seu efeito com uma formulação sem adição de própolis, vacina comercial e PBS esterilizado, em um trabalho conduzido em 63 bovinos. De forma semelhante, com os mesmos grupos de tratamento, mas com a adição de um grupo que recebeu apenas o extrato hidroalcoólico de própolis verde, foi conduzida uma pesquisa em 30 camundongos BALB/c. A pesquisa de anticorpos IgG em bovinos, demonstrou que tanto o tratamento contendo extrato hidroalcoólico de própolis verde quanto a bacterina sem própolis apresentaram resultados semelhantes, superiores aos tratamentos utilizando a vacina comercial e PBS, sendo que nos mesmos tratamentos, foi observada uma resposta com característica humoral inicialmente, tendendo a celular ao longo do experimento. Nos bovinos, a expressão relativa de RNAm para INF- $\gamma$ , IL-2 e CXCR5 foi elevada para o grupo que recebeu a bacterina contendo extrato hidroalcoólico de própolis verde. Os resultados do teste de ELISA

em camundongos, foram semelhantes aos encontrados para os bovinos. O grupo que recebeu apenas o extrato hidroalcoólico de própolis verde sem nenhuma combinação bacteriana, demonstrou resposta com predominância de IgG1 ao longo da pesquisa, semelhante aos grupos de vacina comercial e PBS. No modelo murino, a vacina comercial apresentou índices maiores de expressão de RNAm para as citocinas pesquisadas em esplenócitos. Os resultados obtidos sugerem que a bacterina contendo extrato hidroalcoólico de própolis verde apresenta potencial para atuar como ferramenta no controle da mastite bovina.

**Palavras-chave:** vacina; imunidade; ELISA; qPCR; CXCR5

## Abstract

BANDEIRA, Fernando da Silva. ***Staphylococcus aureus* bacterin containing propolis as adjuvant for mastitis control**. 2015. 112f. Theses (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Bovine mastitis is a global health problem and many scientific advances have occurred, but the treatment and prevention of disease with existing techniques do not present satisfactory results. Similarly, there is growing interest in the use of propolis as an alternative for treatment of mastitis, also being the object of studies in order to use as an adjuvant, although so far it has not been described their use in vaccines for the control of bovine mastitis. The importance of *Staphylococcus* genus as disease agent is well documented, growing need for species identification of the etiologic agent. In a survey of coagulase-positive staphylococci in subclinical mastitis in southern Brazil, was finding its presence in 12.6% of cases with *S. aureus* was present in 17.6% of animal researched. Among the considered coagulase positive *S. aureus* is 85.7%, 8.5%, were *S. intermedius* and 5.8% were identified as *S. hyicus*. For the *S. aureus* penetrate, multiply and keep the host uses multiple pathogenic factors. Was researched in the literature to-date information on the main mechanisms expressed by the bacteria and how they operate, alone or integrated to ensure the penetration of micro-organism in the mammary gland, the processes that mediate the formation of biofilms and their coping strategies the host responses, their internalization in the cells and its continuation mechanisms, resulting in processes that often become chronic. To assist in the control of mastitis, is desirable the use of an effective vaccine and thus has been proposed the use of a bacterin containing hydroalcoholic extract of green propolis in the formulation is desirable, being compared to a similar bacterin without propolis, commercial vaccine and sterile PBS on a work carried out on 63 bovines. Similarly, with the same treatment groups and the addition of a group that received only the hydroalcoholic extract of propolis, a study was conducted on 30 BALB/c mice. The research of IgG antibodies in bovines showed that both treatment containing hydroalcoholic extract of propolis as the bacterin without propolis showed similar results and superior to commercial and PBS treatments, and the same treatment, we observed initially characteristic a humoral response with tending to cellular during throughout the experiment. In bovines, the relative expression of mRNA for INF- $\gamma$ , IL-2 and CXCR5 was raised to the group receiving bacterin containing hidroalcoholic extract of green propolis. The ELISA results were similar to those of bovine in BALB/c still with the group that received only the the alcoholic extract of propolis without any bacterial combination, behaving similarly commercial and PBS, and the response was predominantly IgG1 to during

the research. In the murine model, the commercial vaccine showed higher levels of mRNA expression for the studied cytokines. The results indicate that the bacterin containing alcoholic extract of propolis has the potential to act as a tool in the control of bovine mastitis in the target especie, requiring minor adjustments and a job to prove the efficiency in a challenge.

**Keywords:** vaccine; green propolis; immunity; ELISA; qPCR, CXCR5

## Lista de Figuras

Figura 1	Níveis de IgG total em soro de bovinos inoculados com diferentes formulações de bacterina para controle de mastite e PBS nos dias 0, 21, 42 e 63.....	93
Figura 2	Isotipagem de IgG em soro bovino.....	94
Figura 3	Níveis de IgG total em soro de camundongo BALB/c inoculados com diferentes de bacterina para controle de mastite e PBS nos dias 0, 21, 42 e 63.....	95
Figura 4	Isotipagem de IgG em soro de camundongos BALB/c.....	96
Figura 5	Expressão relativa de RNA de citocinas por leucócitos em bovinos ..	97
Figura 6	Expressão relativa de RNA de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c.....	98

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência de iniciadores qPCR para citocinas em cultivo de leucócitos bovinos.....	99
Tabela 2	Sequência de iniciadores qPCR para citocinas em cultivo de esplenócitos de camundongo BALB/c.....	99

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Aap	Proteína associada ao acúmulo
ATCC	American Type Culture Collection
Bap	Proteína associada ao biofilme
Clf	Fator clumping
CMT	California Mastitis Test
D.O.	Densidade óptica
DCTA	Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAEM	Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Fnbp	Proteína ligante de fibronectina
HIV -1	Vírus da imunodeficiência humana
HLPC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G isotipo 1
IgG2	Imunoglobulina G isotipo 2
IIM	Infecção intramamária
IL-2	Interleucina 2
MEM	Meio Essencial Mínimo
nm	Nanômetros
OPD	<i>o</i> -Phenylenediamine dihydrochloride
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PSM	Modulina fenol solúvel
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

## Lista de Símbolos

°C	Graus centrígados
°GL	graus Gay Lussac
μL	Microlitro
INF-γ	Inteferon gama
M	Molar

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Hipótese .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Artigos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 1 .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Artigo 3 .....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>100</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>101</b>

## 1 Introdução

As doenças que acometem os animais de produção representam riscos à pecuária mundial (RICH e PERRY, 2011). Além da possibilidade de transmissão de enfermidades dos animais para seres humanos, existe uma grande preocupação com as perdas econômicas aos produtores. Nesse contexto, a enfermidade que representa a mais cara e frequente doença dos rebanhos leiteiros em todo o mundo é mastite (LEITNER et al., 2011, PEREIRA, 2011). O termo “mastite” provém da união dos termos gregos “*mastos*”, que significa “mama” e “*ite*”, que significa “inflamação de” (PHILPOT e NIKERSON, 2002). A mastite bovina é uma doença multifatorial e complexa (ANAYA-LOPEZ et al., 2006), presente na maior parte dos rebanhos leiteiros bovinos.

A mastite, a semelhança de um grande número de processos inflamatórios, pode ocorrer a partir de um trauma ou lesão no úbere, após contato do mesmo com substâncias que promovam irritação química, ou principalmente, secundária a uma infecção microbiana (PHILPOT e NIKERSON, 2002; SPANAMBERG et al., 2008). O processo infeccioso decorre da colonização do úbere por agentes patogênicos que atingem o tecido secretor (TALBOT e LACASSE, 2005) e localizam-se no parênquima da glândula (SOUTO et al., 2010).

As manifestações clínicas são reflexos do comprometimento tanto das células epiteliais mamárias quanto pela função alveolar (HU et al., 2010). Isso resulta em alterações na composição do leite, principalmente a redução na síntese de vários componentes, como lactose e caseína, e o aumento considerável na presença de elementos do sangue provenientes da reação inflamatória, como albumina, imunoglobulinas, cloro e sódio (HORTET e SEGGERS, 1998). Associado a alteração de composição, a diminuição de sua produção (MA et al., 2004; DETILLEUX et al., 2015), ocasionam grandes perdas econômicas na produção mundial desse produto (PEREIRA et al., 2010; PELEGRINO, et al., 2010).

O índice das perdas pela mastite pode ser influenciado por uma série de fatores, incluindo o nível de tolerância a enfermidade pelas vacas infectadas (DETILLEUX et al., 2015).

Detilleux et al. (2015), definem a tolerância a enfermidade como a capacidade de reduzir os efeitos negativos da infecção, seja pelas agressões pelos patógenos, o que seria uma tolerância direta, ou através da intensidade da resposta imune, o que seria a tolerância indireta.

A doença, embora possa ser classificada de várias formas é mais comumente dividida de acordo com as manifestações em dois grupos principais que são mastite clínica e mastite subclínica (HASHEMI et al., 2011). A mastite clínica reflete as respostas imunes mais severas, promovendo aumento de volume da glândula mamária (SEARS e McCARTHY, 2003), sendo claramente identificada devido as alterações que promove no leite (GIANNEECHINI et al., 2002). O resultado é a observação da alteração da cor do leite, tornando-se mais amarelado ou com a presença de sangue, além da presença de grumos, facilmente percebidos pelo produtor no momento da ordenha.

Ao contrário da mastite clínica, na subclínica o leite apresenta aspecto normal (PHILPOT e NIKERSON, 2002), ou alterações que não são facilmente perceptíveis, embora essas respondam por 70 a 80% das perdas que ocorrem na produção (GIANNEECHINI et al., 2002). Essa forma da doença ainda é negligenciada, mesmo existindo maneiras de detectá-la, variando desde processos simples que podem ser feitos antes da ordenha, como a técnica de *California Mastitis Test* (CMT), descrito por Schalm e Norlander em 1957, até o uso de equipamentos que realizam a contagem eletrônica de células somáticas (PHILPOT e NIKERSON, 2002). O aumento no número de células somáticas pesquisadas, em casos de mastite subclínica, correspondem ao influxo de leucócitos que ocorre, indicando o grau de infecção intramamário (SEARS e McCARTHY, 2003).

A outra forma de classificar a ocorrência da enfermidade é dividi-la de acordo com os micro-organismos envolvidos em sua ocorrência. A mastite ambiental está relacionada a bactérias presentes no ambiente, contaminando o exterior do teto e a pele do úbere (MENDONÇA et al., 1999). Esses agentes em potencial não infectam normalmente a glândula mamária, sendo capazes de causar infecção quando algum fator permite a sua entrada pela cisterna do teto (REBHUN, 2000). A análise bacteriológica de leite proveniente de animais com mastite clínica por agentes ambientais, pode identificar *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*., *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiela* spp., *Serratia* spp. e *Pseudomonas* spp., entre outros (VASIL, 2009).

A outra classificação, nesse sentido, é a mastite contagiosa, apontada por Mendonça et al. (1999) como sendo a forma mais comum de ocorrência. Nesse caso, os agentes etiológicos colonizam a glândula mamária e podem se disseminar através de descuidos higiênicos com os equipamentos e utensílios, entre os animais no momento da ordenha (REBHUN, 2000).

No grupo das mastites contagiosas, *Streptococcus agalactiae* é responsável por problemas sérios para a saúde dos animais e a rentabilidade da fazenda, promovendo uma doença que pode acontecer de forma aguda ou subclínica, e que leva a diminuição de leite além do risco de infectar outros animais do rebanho (RADTKE et al., 2012).

O grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa tem sido reconhecido como agente etiológico emergente de infecções intramamárias em muitos países, embora seja muitas vezes considerado ainda um patógeno de pouca importância (LOCATELLI et al., 2013). Já Supré et al. (2011), afirmam que esse grupo seria o prevalente nas amostras de leite analisadas a nível mundial. Dessa forma, sua relevância clínica ainda é objeto de discussão (HOSSEINZADEH et al., 2014), mas esses micro-organismos são capazes de elevar o número de células somáticas no leite dos animais afetados (SCHUKKEN et al., 2009), comprometendo a qualidade do leite produzido.

A ocorrência de mastites por *Mycoplasma* spp., também é descrita, sendo a espécie *Mycoplasma bovis* a principal envolvida em casos de mastite nos rebanhos leiteiros comerciais (STIPKOVITS et al., 2013). É um micro-organismo que coloniza a superfície de mucosas oculares, nasais e vestibulares das vacas (BIDDLE et al., 2005). É um agente primário de mastite, provocando uma infecção persistente, caracterizada por ser crônica, progressiva, com diminuição da produção e qualidade do leite produzido (RADAELLI et al., 2011). A transmissão do agente ocorre no momento da ordenha, típica de uma mastite contagiosa (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2011) sendo facilmente controlada com as medidas de higiene estabelecidas (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2010), mas dificilmente tratável por quimioterápicos, associado ao fato de não existir nenhuma vacina eficiente para sua prevenção (RADAELLI et al., 2011; ROSSETTI et al., 2010).

O micro-organismo *Corynebacterium* spp. tem sido identificado como um patógeno presente em 10 a 25% dos casos de infecções intramamárias, normalmente subclínicas, e associados com moderado aumento de células

somáticas nas vacas infectadas (GONÇALVES et al., 2014). Esses mesmos autores citam que apesar da importância que esse agente desempenha em casos de infecções intramamárias, ainda é pouco estudado.

Zadoks e Schukken (2006) baseados em dados de epidemiologia molecular, afirmam que classificar a mastite em contagiosa e ambiental não é totalmente adequado, pois alguns micro-organismos podem apresentar um comportamento essencialmente contagioso e eventualmente ambiental, ou vice e versa.

Os problemas econômicos decorrentes da mastite são inúmeros e são permanente objeto de estudo, conforme descrito anteriormente. Entretanto, frente a uma predominante etiologia bacteriana, as infecções intramamárias estão também no escopo da saúde pública. Dessa forma, um grande número de micro-organismos causadores de mastite, podem estar relacionados a doenças de importância para a saúde humana, formando-se um paradigma entre a qualidade inquestionável dos benefícios nutritivos do leite bovino na alimentação humana e a atenção crescente aos riscos de toxi-infecções alimentares.

A mastite bovina, além dos agentes etiológicos citados anteriormente, pode ser causada por mais de 150 espécies de micro-organismos diferentes (ALMEIDA et al., 2013), sendo que os mais isolados são aqueles pertencentes aos grupos *Streptococci*, *Staphylococci* e grupo dos coliformes (SWEDA et al., 2012).

A bactéria *Staphylococcus* spp. é um importante agente causador de mastite contagiosa, seja ela clínica, subclínica ou crônica. Ao mesmo tempo, representa um importante patógeno envolvido em casos de intoxicação alimentar humana. Essa bactéria é apontada como uma importante causa de infecção primária para várias espécies animais, devido a sua habilidade em se adaptar a diferentes ambientes (ZECONI e SCALI, 2013). Adicionalmente, é um micro-organismo envolvido em vários casos de doenças humanas ou animal envolvendo a pele e mucosas, além de representar um importante agente etiológico envolvido em casos de infecções nosocomiais (SANTOS, 2004).

A classificação taxonômica do gênero *Staphylococcus* o enquadra como pertencente à família Staphylococcaceae, ordem Bacillales, classe Bacilli e filo firmicutes. (SCHIEIFER e BELL, 2009). São micro-organismos gram-positivos e, graças a sua capacidade de se dividirem em dois planos, adquirem formato que lembram cachos de uva (TANG e STRATTON, 2010), podendo também ocorrer aos pares, em formato de tétrade ou cadeias curtas. Em geral, são organismos imóveis

e aeróbios ou anaeróbios facultativos (TANG e STRATTON, 2010; QUINN et al., 2007).

O gênero apresenta mais de 50 espécies e subespécies descritas, sendo que, permanentemente, novas espécies continuam sendo identificadas (TANG e STRATTON, 2010). Com base em um fator de virulência expressado fenotipicamente *in vitro*, denominado coagulase, é possível realizar uma divisão dos micro-organismos do gênero em dois grupos. Em um desses grupos, denominado *Staphylococcus* coagulase positivo, encontram-se cinco espécies, a saber, *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subesp. *coagulans* e *S. delphini*. Nesse grupo, a espécie *S. coagulans* e *S. delphini*, não foram descritas relacionadas a mastite, sendo que essa só foi isolada até o momento em golfinhos (VARALDO et al., 1988). As outras três espécies podem estar relacionadas a inflamação intramamária. Do ponto de vista microbiológico, *S. hyicus* é um micro-organismo que apresenta capacidade de coagulação variável (EUZÉBY, 2004) e dentre os estafilococos considerados coagulase positivo, é o menos isolado em casos de mastite, seguido por *S. intermedius* (CAPURRO et al., 1999).

A espécie *Staphylococcus aureus* é o principal agente envolvido na mastite (PEREIRA et al., 2010), promovendo um processo contagioso em que a bactéria essencialmente passa de um animal infectado a um sadio durante a ordenha (TALBOT e LACASSE, 2005). Entretanto, segundo Schukken et al. (2011), existem outras fontes potenciais de contaminação por esse micro-organismo no ambiente em que a vaca leiteira ocupa. Assim, Ferreira et al. (2006) identificam como importantes pontos de contaminação o alimento e a sala de ordenha, não descartando a importância que o portador humano representa. Zadoks et al. (2006), além da mão do manipulador, ainda apontam a própria ordenhadeira como fator importante na transmissão desse micro-organismo. A epidemiologia da doença frente ao agente demonstra que as vacas que apresentam infecção intramamária por *S. aureus* constituem-se em importantes reservatórios para os outros animais em produção (MA et al., 2004), fazendo com que as perdas causadas sejam severas e caracteristicamente crônicas, com *S. aureus* determinando uma infecção que geralmente acompanha o animal durante toda a sua vida (KAUF et al., 2007).

A ocorrência da doença apresenta caráter multifatorial, mas dependente de deficiências nas defesas orgânicas. A constituição anatômica do animal, mais especificamente, úbere e tetos comportam-se como importantes barreiras frente ao

micro-organismo invasor. Dessa forma, o canal do teto, com seu tampão de queratina é o primeiro obstáculo à penetração de agentes microbianos (TARGOWSKI, 1983). A capacidade da bactéria em se fixar ao tecido e causar lesão na glândula mamária ainda não está completamente estabelecida. No entanto, sabe-se que *S. aureus* é um micro-organismo que apresenta uma grande quantidade de fatores de virulência (KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2011), fundamentais para que o processo inflamatório inicie e se perpetue.

A fixação ao epitélio da glândula mamária é facilitada pela produção de biofilmes pelo micro-organismo (CHAVHAN et al., 2012). Estudos recentes, como o de Coelho et al., (2011) ressaltam a importância da formação de biofilmes para que a infecção intramamária ocorra, pois ele adicionalmente oferece proteção para que a bactéria possa realizar a colonização de objetos inanimados, favorecendo a ocorrência de processos infecciosos.

Ao atingir o interior da glândula mamária, é necessário que *S. aureus* seja interceptado pela atuação fagocitária eficiente, desempenhada por neutrófilos polimorfonucleares (GUIDRY et al., 1994), pois o sucesso microbiano na infecção depende da natureza da resposta do hospedeiro, particularmente da rapidez de recrutamento de neutrófilos. (KAUF et al., 2007).

A correta defesa imunológica da glândula mamária está relacionada a eficiente capacidade de diferenciar entre os elementos estranhos e os componentes do próprio organismo (SORDILLO e STREICHER, 2002). Os neutrófilos, embora sejam eficientes para inativar *S. aureus* no interior da glândula mamária, sofrem a influência dos glóbulos de gordura presentes no leite, os quais são fagocitados. Dessa forma, segundo Guidry et al. (1994) existe a necessidade de um grande número dessas células de defesa, estimando ser em  $9 \times 10^5$  polimorfonucleares por mililitro de leite para prevenir a infecção. Uma vez que a concentração apontada é muito superior a encontrada no leite, torna-se necessário aumentar a eficiência das células já existentes através do aumento de anticorpos (GUIDRY et al., 1994). A fagocitose mediada por anticorpos é apontada como o melhor mecanismo de defesa contra a infecção bacteriana no úbere bovino, conforme Paape et al. (1981) citado por Ma et al. (2004). Adicionalmente, para se evadir das defesas do hospedeiro, *S. aureus* utiliza um polissacarídeo capsular, de grande importância antifagocitária (MA et al., 2004).

A expressão das MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), são fundamentais para que o micro-organismo continue o processo infeccioso. Dentro das MSCRAMM, a proteína “A” estafilocócica merece destaque nos estudos relacionados a mastite por esse agente causal, pela sua atuação voltada a ligação com anticorpos do hospedeiro, seja animal ou humano, dificultando o processo de resposta imune. Assim, tanto a defesa inicial desempenhada pelos polimorfonucleares quanto pelos anticorpos encontra-se prejudicada nas infecções intramamárias por *S. aureus*. A expressão de adesinas, que favorecem aderência precoce ao tecido animal, associada a produção de biofilme também representam importância, levando a infecção crônica e oferecendo resistência anti-fagocitária (PRENAFETA et al., 2010). Além desses citados, existem ainda vários outros mecanismos de patogenicidade que garantem a ocorrência da doença em rebanhos leiteiros, em frequências elevadas.

A incidência de mastite em rebanhos leiteiros aumenta quando os mecanismos de defesa estão enfraquecidos (SORDILLO e STREICHER, 2002), sendo que a falha nos mecanismos de defesa orgânicos, resultam em resposta inflamatória ineficiente, levando a necessidade de utilização de substâncias químicas, geralmente com o emprego de antimicrobianos. Porém a existência de uma grande variedade de produtos antimicrobianos não é garantia de sucesso no controle das mastites bovinas. Ao contrário, mesmo que cuidados higiênicos durante a ordenha sejam associados aos protocolos terapêuticos adequados, percebe-se que essas medidas são capazes de diminuir a incidência da infecção, mas não erradicá-la (TALBOT e LACASSE, 2005). Provavelmente a formação de biofilme esteja relacionada a proteção do micro-organismo contra a atuação desses produtos (SNEL et al., 2014).

Os antimicrobianos usados no controle de mastite, não apresentam muita eficiência frente a *S. aureus* (TALBOT e LACASSE, 2005), particularmente em inflamações profundas do tecido secretor (MA et al., 2004) sendo que o micro-organismo é muitas vezes resistente aos produtos comumente utilizados para o tratamento da infecção intramamária em bovinos leiteiros. Somam-se ainda os isolados emergentes que resistem a praticamente todos os antimicrobianos existentes, sendo que BAGNOLI et al. (2012) apontam para a necessidade da utilização de uma vacina eficiente contra esse agente.

A existência de pressões mundiais para limitar o uso de antimicrobianos em bovinos leiteiros (PELEGRINO et al., 2010), estimula os pesquisadores a concentrar suas atenções para o estímulo de mecanismos de defesas naturais dos animais, diminuindo o risco da presença de resíduos de antimicrobianos e atendendo ao mercado consumidor que, muitas vezes, busca “produtos orgânicos” (McDOUGALL et al., 2009). Dessa forma, a exploração de substâncias naturais para o controle de mastite, frente a nova realidade existente com relação a fármacos tradicionais, tem sido demonstrada por vários pesquisadores. Assim, o uso de substâncias a base de plantas, denominados genericamente de fitoterápicos, é um método usado em várias etapas do processo de ordenha com a finalidade de reduzir a contaminação microbiana de uma forma geral. Schuch et al. (2008), descrevem o uso de plantas medicinais frente a *S. aureus* e verificaram sua eficiente atividade bactericida nesse caso. Recentemente, um outro produto que tem merecido destaque para utilização como sanitizante com função preventiva e curativa de mastites estafilocócicas é a própolis.

A própolis, também chamada “cola de abelha” (BANKOVA et al., 2000), é um produto empregado na medicina popular (SCAZZOCCHIO et al., 2006). Definida como uma substância natural, produzida pelas abelhas (*Apis* spp.) a partir de material resinoso e balsâmico, coletado em flores, pólen, ramos, brotos, fluxos de seiva e exsudatos de plantas, ou outras fontes botânicas (LOTTI et al., 2010), adicionados de secreções salivares e enzimáticas desses insetos em suas colméias (LUSTOSA et al., 2008; ASHRY e AHMAD, 2012). Seu uso já era realizado pelos egípcios para embalsamar seus mortos em função de sua atividade anti-putrefativa, sendo que e os gregos e romanos buscavam nessa substância sua capacidade anti-séptica e cicatrizante. Ainda no curso da história, há relatos do seu uso como substância anti-pirética pelos incas e foi listada na 17ª Farmacopéia Inglesa como uma droga oficial (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

As abelhas o utilizam como um selante para espaços indesejados abertas na colmeia (LOTTI et al., 2010), para fechar frestas e diminuir a abertura do alvado, além do embalsamento de insetos invasores mortos, prevenindo a putrefação atuando como um antisséptico e antimicrobiano evitando a proliferação bacteriana na colmeia (ASHRY e AHMAD, 2012).

A composição química é qualitativa e quantitativamente variável (LOTTI et al., 2010; FISCHER et al., 2008), dependente da épocas do ano, das regiões, da área

de coleta e da variação floral. Estudos demonstram que mais de 300 constituintes estão presentes (FISCHER et al., 2007b), incluindo compostos fenólicos e flavonoides derivados dos ácidos hidroxicinâmico (BANKOVA et al, 2000). Em geral, apresenta as substâncias mais pegajosas vegetais (LOTTI et al., 2010), sendo composto por 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 10% de grãos de pólen e outras substâncias (ASHRY e AHMAD, 2012). É necessário que o produto tenha sido adequadamente caracterizado, para que se possa fazer inferência sobre os efeitos obtidos.

A coloração varia entre o verde, o vermelho e o marrom, com odor característico em função dos óleos voláteis que apresenta (ASHRY e AHMAD, 2012). Embora a coloração marrom escura seja a mais comum, a própolis vermelha é encontrada em países tropicais, como o Brasil e Cuba (LOTTI et al., 2010).

A própolis verde brasileira é uma substância resinosa produzida a partir de *Baccharis dracunculifolia* por abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), apresentando componentes completamente diferentes daqueles encontrados em própolis de outras localidades (NAKASHIMA et al., 2014).

O uso de formulações contendo própolis em sua composição, foi testada por Loguércio et al. (2006), utilizando isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite, demonstrando a sensibilidade desse micro-organismo *in vitro* e constituindo-se em alternativa ao tratamento da enfermidade. No mesmo sentido, Pinto et al. (2001) descrevem a eficiência de própolis verde, na concentração de 100mg/mL como alternativa aos antimicrobianos, demonstrando eficiência significativa contra uma série de micro-organismos isolados de mastite, incluindo-se a bactéria *S. aureus*.

O uso de antibióticos intramamários como terapia visando prevenir ou eliminar infecções crônicas por *S. aureus* tem demonstrado insucesso (PELLEGRINO et al., 2010). As lacunas deixadas pelo tratamento antimicrobiano, sejam eles produtos alopáticos ou fitoterápicos, faz com que seja interessante a utilização de uma medida imunoprolifática que assegure a prevenção e o controle dessa doença (MA et al., 2004). Assim, medidas alternativas devem ser utilizadas e, nesse contexto, o uso de vacinas é uma ferramenta a ser considerada (CAMUSSONE et al., 2010; TALBOT e LACASSE, 2005).

A vacinação é uma prática comum no controle de várias doenças infecciosas (MIDDLETON et al., 2009), e o uso de vacinas é desejável para a prevenção e o controle da mastite bovina (MA et al., 2004), embora a prática de vacinação não seja uma atividade de rotina para prevenção da mastite bovina em rebanhos leiteiros (PELLEGRINO et al., 2010).

A imunização ativa ou vacinação é um processo que consiste em introduzir um antígeno no sistema imune do hospedeiro (LIMA et al., 2004), facilitando a prevenção ou reduzindo as manifestações de um agente infeccioso patogênico no homem ou nos animais (ASHRY e AHMAD, 2012). Esse processo ocorre por um estímulo que mimetiza o desenvolvimento de uma imunidade naturalmente adquirida pela inoculação de um agente com reduzida capacidade patogênica, mas com componentes imunogênicos para o patógeno em questão ou organismos relacionados (MEEUSEN et al., 2007). A vacinação é sem dúvida, uma estratégia fácil e comum para o controle das doenças infecciosas (TALBOT e LACASSE, 2005).

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* são controladas com medidas de higiene, manejo correto da ordenha e antibioticoterapia, embora muitas vezes essas práticas não sejam suficientes para o controle da doença, restando apenas o descarte de vacas cronicamente infectadas (CAMUSSONE et al., 2014). Nessas situações, a imunização tem se mostrado como uma abordagem racional para o controle da mastite estafilocócica (PELLEGRINO et al., 2008). Algumas características da bactéria, como a habilidade de produzir biofilme, capacidade de sobreviver no interior de células epiteliais e macrófagos e resistir a antibióticos, justifica o desenvolvimento de vacinas para a proteção contra novas infecções por esse micro-organismo em bovinos leiteiros (PEREIRA et al., 2011).

A vacinação tem sido apontada como complemento as medidas clássicas para controle de inflamações intramamárias por *S. aureus* (CAMUSSONE et al., 2014). A imunização pela sua potencial importância como medida de controle da mastite, tem sido objeto de pesquisas, sendo que a prevenção da mastite com o uso de vacinas apresenta diversos protocolos (TALBOT e LACASSE, 2005), embora até o momento nenhum tenha se mostrado totalmente eficiente (KAUF et al., 2007). Dessa forma, para que a vacinação pode desempenhar um papel útil em programas de controle da mastite, são necessários estudos de desafio, com tamanhos amostras apropriados e grupos controles estabelecidos (BRADLEY et al., 2014).

A utilização de bacterinas é um processo que permite a redução dos sinais clínicos da enfermidade e aumenta a resistência do rebanho contra infecções intramamárias (PELLEGRINO et al., 2008). Dessa forma, observações feitas por Alberton et al. (2001), em um experimento utilizando vacas Jersey na região metropolitana de Curitiba (Paraná), demonstraram que houve redução nos casos de mastite clínica, com menor gravidade dos casos de mastite subclínica entre os animais que receberam doses de vacinas em períodos semanais durante o período de lactação.

O produto ideal seria, segundo Leitner et al (2011), uma vacina com um antígeno definido e com amplo espectro de atividade anti-estafilocócica. A cepa utilizada para a produção da bacterina deve levar em conta a presença de algum importante fator que assegure a proteção contra a enfermidade. Assim, tem sido comum a utilização de cepas de *S. aureus* produtores de cápsula bacteriana (CAMUSSONE et al., 2010).

Atualmente, existem no mercado duas vacinas comercialmente disponíveis para controle de infecções intramamárias em bovinos (CAMUSSONE et al., 2014), embora no mercado brasileiro apenas uma pode ser encontrada. O produto de nome comercial Lysigen® apresenta como adjuvante o hidróxido de alumínio e possui um lisado de cinco cepas inteiras de *S. aureus*, que apresentam cápsula polissacarídica, pertencente aos sorotipos 5, 8 e 336 (MA et al., 2004). A outra vacina disponível, apresenta cepas de *S. aureus* produtoras de *slime* associados ao complexo antigênico (SAAC), formulada em adjuvante oleoso (CAMUSSONE et al., 2014).

A resposta imunológica do organismo é estimulada, no caso do uso de vacinas, além de fatores de virulência inerentes ao micro-organismo, também com o uso de substâncias denominadas adjuvantes. Os adjuvantes são definidos como agentes farmacológicos ou imunológicos que, além de estimular o sistema imune, podem aumentar, modular ou prolongar a imunogenicidade intrínseca de antígenos co-administrados, aumentando a eficácia da vacina (HORA et al., 2011). Assim, estudos pioneiros de Opdebeeck e Norcros (1984), testando diferentes tipos de adjuvantes em vacinas contra *S. aureus*, demonstraram que apenas o adjuvante incompleto de Freund foi capaz de manter níveis relativamente altos de anticorpos ao longo do período de lactação. Ainda, no sentido do uso de adjuvantes vacinais usados em vacinas contra mastites estafilocócicas, pesquisando a literatura encontra-se a descrição do uso de hidróxido de alumínio (HU et al., 2003;

ALBERTON et al., 2001), sulfato dextran (WATSON et al., 1996) e sulfato dextran associado ao adjuvante incompleto de Freund (WATSON, 1992).

Uma substância que tem merecido atenção nos últimos anos, sendo usado como adjuvante vacinal, é a própolis. Além das reconhecidas ações no tratamento de enfermidades e atividade antimicrobiana citadas anteriormente, ela é descrita na literatura científica como um adjuvante seguro, de baixo custo e com alta eficiência (MA et al., 2011). Embora a composição desse produto seja bastante variável, já foi identificado que os compostos fenólicos nele presentes, apresentariam atuação imunoestimulante com a proliferação de linfócitos, conforme Ivanoska et al. (1995), citado por Fischer et al. (2007a). Resultados promissores, utilizando fragmentos de compostos fenólicos de própolis como adjuvante vacinal, são descritos por Fischer et al. (2010), em vacinas contra herpesvírus suíno tipo-I. Fischer et al. (2007a), descrevem o uso de própolis verde associado a óleo mineral como adjuvante em uma vacina contra herpesvírus bovino tipo 5, obtendo um aumento significativo de anticorpos neutralizantes, quando comparado ao uso de hidróxido de alumínio, demonstrando uma promissora e desejável resposta humoral em bovinos para esse agente etiológico.

Ao pesquisar a literatura percebe-se que, embora existam várias citações do uso de própolis com diversas finalidades, incluindo a sua descrição como adjuvante vacinal, não foi encontrada nenhuma referência ao seu uso em bacterinas contra a mastite estafilocócica. Dessa forma, objetivou-se esse trabalho, visando contribuir com o conhecimento de como essa substância coopera no processo de indução de imunidade humoral e celular, colaborando no controle da enfermidade.

## **2 Hipótese**

A bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante vacinal para controle da mastite, induz resposta imunológica protetora contra a enfermidade, de forma igual ou superior ao produto comercial existente.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma bacterina contra *Staphylococcus aureus* utilizando extrato hidroalcoólico de própolis verde como adjuvante vacinal e avaliar a sua influência na resposta imune animal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e padronizar uma bacterina contra *S. aureus* associado a um extrato hidroalcoólico de própolis verde, utilizando camundongo BALB/c como modelo biológico.

- Mensurar as respostas imune humoral e celular induzidas pelo uso de bacterina contra *S. aureus* associado a um extrato hidroalcoólico de própolis verde, utilizando camundongo BALB/c como modelo biológico.

- Avaliar do desempenho da bacterina contra *S. aureus* associada a um extrato de própolis verde em bovinos, mensurando a resposta imune sistêmica.

- Comparar o efeito da bacterina contra *S. aureus* com a bacterina comercial contra a bactéria.

## **4 Artigos**

### **4.1 Artigo 1**

**Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica,  
na região sul do Rio Grande Sul**

**Bandeira, F. S.; Picoli, T; Zani, J. L.; Silva, W. P.; Fischer, G.**

**Submetido à revista Arquivos do Instituto Biológico**

**(<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572013000100001>)**

1 Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do  
2 Rio Grande do Sul

3 Fernando da Silva Bandeira<sup>1</sup>

4 <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Saúde Populacional - Faculdade de Veterinária,  
5 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brasil. –  
6 bandeiravett@gmail.com

7 Tony Picoly<sup>1</sup>

8 João Luiz Zani<sup>1</sup>

9 Wladimir Padilha da Silva<sup>3</sup>

10 Geferson Fischer<sup>2</sup>

## 11 **Resumo**

12 A mastite bovina é uma doença importante na exploração leiteira, não apenas pelas perdas  
13 econômicas diretas que promove, mas também pelas perdas indiretas e o potencial risco a  
14 saúde pública. Dentre as principais causas de infecções intramamárias, destacam-se as  
15 bactérias do gênero *Staphylococcus* spp, sendo que *Staphylococcus aureus* é o agente  
16 etiológico predominantes em mastite subclínica. O objetivo desse trabalho foi verificar a  
17 frequência de mastite subclínica em oito rebanhos localizados na região sul do Rio Grande do  
18 Sul (Brasil) e a relação da enfermidade com a presença de *Staphylococcus aureus*.  
19 Adicionalmente, pesquisou-se a presença de *S. intermedius* e *S. hyicus* nas amostras de leite  
20 obtidas. Para identificação da doença, utilizou-se o California Mastitis test (CMT). A  
21 identificação da espécie de *Staphylococcus* spp. foi feita em meio de cultura Ágar Baird-  
22 Parker, com posterior confirmação das colônias suspeitas em coloração de gram, prova de  
23 catalase, pesquisa de coagulase livre e pesquisa de termonuclease. A mastite subclínica foi  
24 constatada em 53,6% dos animais testados. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva  
25 foi identificada em 12,6% dos animais com mastite subclínica. Nesses mesmos animais, a

26 bactéria identificada como *S. aureus*, foi o agente etiológico presente em 17,6% dos casos.  
27 Adicionalmente, pode-se perceber que dentre o grupo identificado como coagulase positiva,  
28 85,7% corresponderam a *S. aureus*, enquanto 8,5% mostraram características bioquímicas  
29 compatíveis com *S. intermedius* e 5,8% foram consideradas *S. hyicus*.

30 **Palavras-chave:** coagulase, leite, intermedius, hyicus.

31

32 Frequency of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases, in southern Rio  
33 Grande do Sul

#### 34 **Abstract**

35 Bovine Mastitis is an important disease in dairy farming, not only by promoting direct  
36 economic losses, but also for indirect losses and the potential risk to public health. Among the  
37 main causes of intramammary infections, there are the bacteria of the  
38 genus *Staphylococcus* spp. The main causes of intramammary infections, there are the  
39 bacteria of the genus *Staphylococcus* spp, and *Staphylococcus aureus* is the predominant  
40 etiologic agent in subclinical mastitis. The aim of this study was to determine the frequency of  
41 subclinical mastitis in herds located in eight herds from southern Rio Grande do Sul  
42 (Brazil) and the relationship of the disease with the presence of *Staphylococcus aureus*. In  
43 addition, we investigated whether the presence of *S. intermedius* and *S. hyicus* in milk  
44 samples obtained. For identification of the disease, we used the California Mastitis Test  
45 (CMT). Identification of *Staphylococcus* spp. Species was made in culture medium agar  
46 Barid-Parker, with subsequent confirmation of suspected colonies on Gram  
47 stain, catalase test, coagulase-free and thermonuclease research. The subclinical mastitis was  
48 identified in 53.6% of animals tested. The presence of coagulase positive *Staphylococcus* was  
49 identified in 12.6% of animals with subclinical mastitis. In these same animals,  
50 bacteria identified as *S. aureus* were the etiologic agent present in 17.6% of cases.

51 Additionally, it could be noticed that among the group identified as coagulase positive, 85.7%  
52 corresponded to *S. aureus*, while 8.5% had biochemical characteristics consistent  
53 with *S. intermedius* and 5.8% were considered *S. hyicus*.

54 **Key words:** coagulase, milk, intermedius, hyicus.

## 55 **Introdução**

56 A mastite bovina é uma enfermidade de significativa importância econômica (PEREIRA et  
57 al., 2010), acometendo praticamente todos os rebanhos produtivos mundiais. É uma doença  
58 com aspectos multifatoriais (ANAYA-LOPEZ et al., 2006), decorrente da colonização do  
59 tecido secretor do úbere por agentes patogênicos (TALBOT; LACASSE, 2005). As perdas  
60 ocasionadas pela mastite decorrem da menor quantidade de leite produzido (LADEIRA,  
61 2007). Além disso, ocorre diminuição da qualidade do leite dos quartos afetados (OLIVEIRA  
62 et al., 2011) com alterações na sua composição (MA et al., 2010), que resultam em  
63 interferência na tecnologia industrial para elaboração de derivados (REBHUN, 2000).

64 A mastite provoca alterações físicas, químicas e microbiológicas no leite produzido  
65 (RADOSTITS et al. 2002), as quais servem de critérios para a classificação da enfermidade e  
66 indicativo de diagnóstico inicial da doença, usando-se as alterações visuais diretas no leite  
67 ordenhado (formação de grumos e alterações de cor) ou indiretas, percebidas através do teste  
68 de CMT (*California Mastitis Test*) (COSTA 2008).

69 O gênero *Staphylococcus* spp. compreende o principal gênero envolvido em casos de mastite  
70 subclínica (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). A participação da espécie *Staphylococcus*  
71 *aureus*, um patógeno que pode ser rotineiramente encontrado no úbere de bovinos, merece  
72 destaque como importante espécie causadora de mastite (BADOSH; MELO, 2011). Além das  
73 perdas econômicas, essa espécie bacteriana representa potencial risco à saúde pública, uma  
74 vez que apresenta a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis (VIÇOSA et al.,  
75 2010).

76 O objetivo desse trabalho foi pesquisar a ocorrência da mastite subclínica em rebanhos  
77 bovinos da região sul do Rio Grande do Sul e a frequência de *S. aureus* presentes nesses  
78 casos.

### 79 **Material e métodos**

80 As amostras de leite utilizadas nesse estudo foram obtidas em oito propriedades rurais,  
81 localizadas na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Os animais utilizados nesse estudo  
82 estavam divididos em seis rebanhos da raça Jersey e dois rebanhos da raça Holandesa,  
83 submetidos a duas ordenhas diárias com intervalo de 10 a 12 horas entre cada uma delas. O  
84 número total de vacas em diferentes estágios de lactação, nas propriedades amostradas foi de  
85 423 animais, os quais foram submetidos ao teste de CMT (SCHALM; NOORLANDER,  
86 1957) para pesquisa de mastite subclínica, durante a rotina de ordenha em cada propriedade.  
87 O critério para identificar a mastite subclínica seguiu a interpretação do resultado conforme  
88 proposto por BELLOTI (1992).

89 Uma vez observada a presença de mastite subclínica, os tetos representantes de cada quarto  
90 afetado sofreram antissepsia com álcool 70°GL e aproximadamente 10mL de leite foi  
91 coletado em tubos de vidro previamente esterilizados, identificados e mantidos em caixas  
92 isotérmicas, sendo encaminhadas ao laboratório para as análises microbiológicas.

93 As amostras provenientes das propriedades pesquisadas foram inoculadas inicialmente em  
94 meio de cultura Ágar Baird-Parker, usualmente empregado para pesquisar *Staphylococcus*  
95 spp. em alimentos (VIÇOSA et al., 2010), utilizando a metodologia descrita por BENNET;  
96 LANCETT (1995). Considerou-se como características presuntivas para *Staphylococcus* spp.,  
97 as colônias apresentando forma circular, coloração preta ou cinza escura, diâmetro de  
98 aproximadamente dois milímetros, apresentando uma massa de células esbranquiçada nas  
99 bordas e um halo transparente ou zona opaca ao redor da colônia (SILVA et al., 2007).

100 As colônias suspeitas obtidas na etapa anterior foram submetidas a coloração de gram e prova  
101 da catalase. Adicionalmente foi realizada a pesquisa de coagulase livre, empregando-se a  
102 metodologia descrita por YASDANKHAN; OLSEN (1998). De forma complementar, ainda  
103 foi efetuada a pesquisa de Nuclease Termoestável (termonuclease ou TNase), utilizando-se a  
104 metodologia descrita por Siqueira (1995).

105 As colônias bacterianas identificadas como coagulase positiva e/ou termonuclease positiva,  
106 foram submetidas a provas de fermentação aeróbica de manitol e maltose seguindo a  
107 metodologia e interpretação descrito por BELLOTI (1992) e produção de acetoína usou  
108 metodologia proposta por PHILLIPS; NASH (1985). O critério utilizado para identificar a  
109 espécie de *Staphylococcus* spp. encontrada foi adaptada de JAY (2000), JABLONSKI;  
110 BOHACH (1997) e BELLOTI (1992).

### 111 **Resultados e discussão**

112 O uso do CMT identificou mastite subclínica em 227 vacas em lactação, de um total de 423  
113 animais analisados, representando 53,6% da ocorrência na população amostrada. A variação  
114 de mastite subclínica entre as oito propriedades pesquisadas ficou entre 32,2% e 69%. O  
115 resultado obtido nesse trabalho demonstra que o índice de mastite subclínica é alto, mesmo  
116 com o investimento em educação proporcionado pelo serviço de extensão de empresas  
117 laticinistas e de instituições de ensino e pesquisa regionais.

118 A preocupação com a frequência dessa enfermidade não é recente e há uma variação entre os  
119 dados obtidos em vários estudos. Assim, os dados encontrados são superiores aos 44,7% de  
120 ocorrência dessa enfermidade, relatados por SILVA (1998) em trabalhos com animais da  
121 região geográfica próxima a utilizada nesse experimento. Na mesma região geográfica,  
122 RIBEIRO et al. (2003) encontraram positividade de 37,6% na prova de CMT. Índices  
123 menores que os encontrados nesse trabalho também foram descritos por COSTA (2008) que  
124 relata a ocorrência da doença em 9,85% dos animais pesquisados na região sul de Minas

125 Gerais. Ainda, OLIVEIRA et al. (2011) descrevem uma prevalência de mastite subclínica de  
126 15,6% da enfermidade em vacas mestiças da região de Rondon do Pará e LANGONI et al.  
127 (2009), analisando rebanhos leiteiros em produção orgânica, encontraram 44,0% de mastite  
128 subclínica.

129 Entretanto, COSTA et al. (1995) verificaram que 72,5% das vacas provenientes de Rebanhos  
130 de São Paulo e Minas Gerais apresentavam mastite subclínica, demonstrando valores  
131 superiores ao encontrados nessa pesquisa.

132 A presença de *Staphylococcus* spp. coagulase positivo foi encontrada em 12,6% dos animais  
133 que demonstraram mastite subclínica frente a prova de CMT, com a metodologia de  
134 identificação microbiana utilizada. Esse resultado está abaixo da frequência encontrada por  
135 COSTA (2008), na região sul de Minas Gerais, que relatou 34,2% de ocorrência para esse  
136 grupo de micro-organismos.

137 A bactéria *S. aureus* esteve presente em 17,6% dos casos identificados de mastite subclínica.  
138 Resultado semelhante foi encontrado por OLIVEIRA et al. (2011), que estudando mastite  
139 subclínica em vacas provenientes de rebanhos mestiços no Pará, encontraram uma prevalência  
140 de 17,7% de mastite subclínica por *S. aureus*.

141 Contudo, os dados obtidos na presente pesquisa estão abaixo dos resultados obtidos por  
142 OLIVEIRA et al. (2009), que trabalhando com rebanhos leiteiros de Sergipe, encontraram *S.*  
143 *aureus* em 21,9% dos rebanhos leiteiros estudados com mastite subclínica. Nos estudos de  
144 RIBEIRO et al (2009), essa espécie bacteriana esteve presente em 25,7% dos casos de mastite  
145 clínica e subclínica. Ainda LANGONI et al. (2009), demonstraram dados de que 18,2% das  
146 vacas com mastite, no município de Botucatu, apresentavam infecção por *S. aureus*. Em  
147 proporções semelhantes, SANTOS et al. (2010) relataram uma frequência de 18,7% para essa  
148 espécie bacteriana em casos de mastite na bacia leiteira de Santa Isabel do Oeste, no estado do  
149 Paraná.

150 Os dados encontrados nesta pesquisa e na bibliografia confirmam a afirmação de  
151 SCHLEGELOVÁ et al. (2003), que apontaram *S. aureus* como sendo uma das espécies mais  
152 comumente envolvida em casos de infecções intramamárias em bovinos, além de ser a  
153 responsável pelas maiores perdas econômicas das explorações leiteiras em todos os  
154 continentes.

155 A frequência relativamente baixa de mastite subclínica por *S. aureus* demonstrada nesse  
156 trabalho, pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo apoio realizado por órgãos de  
157 fomento junto aos produtores rurais. Assim, a assimilação dos conhecimentos e a utilização  
158 das informações recebidas, colabora na prevenção de disseminação da enfermidade por essa  
159 espécie bacteriana em especial, uma vez que o principal momento de sua transmissão ocorre  
160 durante a rotina normal de ordenha dos animais.

161 Dentre as colônias consideradas coagulase positivas, 85,7% corresponderam a *S. aureus*,  
162 enquanto 8,5% mostraram características bioquímicas compatíveis com *S. intermedius* e 5,8%  
163 foram consideradas *S. hyicus*.

164 COSTA (2008) demonstra que, das 360 amostras consideradas como estafilococos coagulase  
165 positiva, provenientes de rebanhos identificados com mastite na região sul de Minas Gerais, *S.*  
166 *aureus* foi identificado em 97,7% das vezes. A frequência de *S. intermedius* e *S. hyicus*, para  
167 o mesmo grupo foi, respectivamente, 1,1% e 0,8%. CAPURRO et al. (1999), em trabalho com  
168 rebanhos leiteiros da Suíça, demonstraram que 97% das infecções intramamárias ocasionadas  
169 por estafilococos coagulase positiva, eram devidas a *S. aureus*, enquanto que *S. intermedius*  
170 foi isolado em 2% e *S. hyicus* foi identificado em 1% para esse parâmetro. Embora existam  
171 variações nos percentuais encontrados, a semelhança da presente pesquisa, os demais autores  
172 também encontraram a predominância de *S. aureus*, seguido de *S. intermedius* e *S. hyicus* em  
173 casos de mastite, especificamente analisando-se o grupo de estafilococos coagulase positiva.

174 A espécie *S. aureus* também foi a principal, dentre o grupo de estafilococos coagulase  
175 positiva identificada por SANTOS et al. (2010), em 81% dos isolamentos, em vacas leiteiras  
176 do Oeste do Paraná. Entretanto, esses autores descrevem que *S. hyicus* foi isolado em 15,2%  
177 desse grupo, sendo a segunda espécie mais encontrada. A espécie menos identificada, *S.*  
178 *intermedius*, apareceu em 3,8% de seus isolamentos.

179 Os resultados obtidos nesta pesquisa e amparados pelos demais trabalhos da literatura,  
180 demonstram ser interessante a realização de provas bioquímicas ou fenotípicas adicionais para  
181 identificação da espécie envolvida em infecções intramamárias.

182 Em 72,5% das cepas identificadas como *S. aureus*, ocorreu a produção de coagulase e  
183 termonuclease. SILVA (1998), trabalhando com rebanhos leiteiros da região sul do Rio  
184 Grande do Sul, encontrou todas as cepas positivas para ambas as provas.

185 As cepas identificadas como *S. hyicus* mostraram variação na capacidade de produção de  
186 coagulase e termonuclease. Assim, desta espécie, verificou-se que 71,4% expressaram apenas  
187 a produção de termonuclease, enquanto 14,3% produziram apenas coagulase. Ambas as  
188 enzimas foram produzidas por 14,3% das cepas. Esse resultado pode ser considerado normal,  
189 uma vez que a espécie *S. hyicus* é considerada como sendo coagulase variável, conforme  
190 HASLER et al. (2008).

191 A produção de termonuclease e coagulase ocorreu em todas as cepas identificadas como *S.*  
192 *intermedius*.

193 Os dados obtidos com a utilização da pesquisa de termonuclease, permitem indicar a sua  
194 utilização como uma prova auxiliar na identificação de *Staphylococcus* spp.. Afinal, trata-se  
195 de uma prova de fácil execução, pouca subjetividade na leitura e que pode ser facilmente  
196 adaptada à rotina laboratorial. Porém, ela não deve servir como substituta a pesquisa de  
197 coagulase, mas sempre utilizada no sentido de complementação.

198 Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que a frequência de mastite subclínica  
199 nos rebanhos estudados é alta, sendo que em 17,6% dos casos, o agente etiológico isolado foi  
200 *S. aureus*. Embora a mastite seja uma doença de difícil erradicação na exploração leiteira,  
201 cuidados relacionados ao manejo durante a ordenha devem ser explorados de melhor forma, a  
202 fim de evitar a disseminação de agentes infecciosos.

### 203 **Referências**

- 204 ANAYA-LÓPEZ, J.L.; CONTRERAS-GUZMÁN, O.E.; CÁRABEZ-TREJO, A.;  
205 BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; VALDEZALARCÓN, J.J.; OCHOA-  
206 ARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine  
207 mastitis. *Research in Veterinary Science*. v.81, n.3, p.358-361, 2006. Disponível em  
208 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528806000671>> Acesso em: 31 mar.  
209 2011.
- 210 ARAÚJO, W. P. Staphylococcus aureus em leite cru. Caracterização da origem provável,  
211 humana ou bovina, das cepas isoladas. *Hora Veterinária*. Ano.9, n.49. 1989.
- 212 BELLOTI, V. *Mastite subclínica bovina: ocorrência, caracterização bioquímica e perfil*  
213 *plasmidial dos Staphylococcus coagulase negativos*. 1992. 95f. Dissertação. (Mestrado em  
214 Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências, Universidade de São Paulo. 1992.
- 215 BENNETT, R. W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: *Bacteriological Analytical*  
216 *Manual*. 8th. ed. Gaithersburg: FDA, 1995. p. 12.01-12.05.
- 217 CAPURRO, A.; CONHA, C.; NILSON, L.OSTENSSON, K. Identification of coagulase-  
218 positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 40, n. 4,  
219 p. 315-321, 1999.
- 220 COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R. Índices de mastite bovina clínica e  
221 subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina*  
222 *Veterinária*. v.17, n.5, p.215-217, 1995.

- 223 COSTA, G. M. *Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas*  
224 *Geraiis*. 2008. 123p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária,  
225 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- 226 DUTTA, G.N.; SAXENA, R. K.; BURAGOHAIN, J. Economic implications of treatment of  
227 lactating cows for subclinical mastitis. *Indian Veterinary Journal*. v.72, p.420-422.1995.
- 228 HARVEY, J. GILMOUR, A. Applications of current methods for isolation and identification  
229 of Staphilococci in raw bovine milk. *Journal of Applied Microbiology*. v.59, p.207-221,  
230 1985.
- 231 HASSLER, C.; NITZSCHE, S.; IVERSEN, C.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Characteristics  
232 of Staphylococcus hyicus strains isolated from pig carcasses in two different slaughterhouses.  
233 *Meat Science*. v.80, n.2, p. 505-510, 2008. Disponível em  
234 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174008000326>>. Acessado em 22  
235 ago 2011.
- 236 HILL, B. M. The thermo-stable nuclease test as a method for identifying *Staphylococcus*  
237 *aureus*. *The Australian Journal of Dairy Technology*. v.38, n.3, p.95-96, 1983.
- 238 JABLONSKY, L.M.; BOHACH, G.A. Staphylococcus aureus. In: DOYLE, M.P.;  
239 BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed). *Food Microbiology.: Fundamentals and*  
240 *Frontier*. Washington: ASM Press, 1997, p.353-376.
- 241 JAY, J.M. Staphylococcal Gastroenteritis. In: \_\_\_\_\_. *Modern Food Microbiology*.  
242 Maryland: Aspen Publishers, 2000. p.441-459.
- 243 LADEIRA S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA F; SCHILD A.L.; LEMOS R.A.A.;  
244 BORGES J.R.J. (Ed). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3ª ed. Santa Maria: Editora  
245 Pallotti, 2007. p.359-370.

- 246 LANGLOIS, B. E.; PARLINDUNGAN, A. K.; HARMON, R. J.; AKERS, K. Biochemical  
247 characteristics of Staphylococcus species of human and bovine origin. *Journal of Food*  
248 *Protection*. v.53, n.2, p.119-126, 1990.
- 249 LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. F.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R.  
250 C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de  
251 produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.29, n.11, p.881-886, 2009.
- 252 NADER FILHO, A.; ROSSI JR., O. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Mastite subclínica  
253 em rebanhos produtores de leite tipo “B”. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e*  
254 *Zootecnia*. n.35, v.5, p.621-629, 1983.
- 255 MA, J; COCCHIARO J.; LEE J. Evaluation of Serotypes of Staphylococcus aureus Strains  
256 Used in the Production of a Bovine Mastitis Bacterin. *Journal of Dairy Science*. v.87, n.1,  
257 p.178-182. 2004. Disponível em  
258 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030204731562>> Acesso em: 9 abr.  
259 2011.
- 260 OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação  
261 microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe.  
262 *Ciência Animal Brasileira, Goiânia*. v.10, n.1, p.226-230, 2009. Disponível em  
263 <[www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/1780/4589](http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/1780/4589)> . Acesso em: 13 jul 2011.
- 264 OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. da S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA,  
265 J. A. S; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da  
266 mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária*  
267 *Brasileira*. v.31, n.2, p.104-110. 2011. Disponível em  
268 <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n2/02.pdf>>. Acesso em: 15 jul 2011.

- 269 PEREIRA, U. P.; OLIVEIRA D.G.S.; MESQUITA L.R.; COSTA G.M.; PEREIRA L.J.  
270 Efficacy of Staphylococcus aureus vaccines for bovine mastitis: A systematic review.  
271 *Veterinary Microbiology*. v.14, n.1-2, p. 117-124, 2010. Disponível em  
272 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510004761>>. Acesso em: 31 mar.  
273 2011.
- 274 PHILLIPS, E.; NASH, P. Culture media. In: LENETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER,  
275 W.J.; SHADOMY, H.J. (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 4 ed. Washington: American  
276 Society for Microbiology, 1985. p.1051-1092.
- 277 PYÖRÄLÄ, S.; TAPONENA, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis  
278 pathogens. *Veterinary Microbiology*. v. 134, n.1-2, p.3-8, 2009. Disponível em  
279 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800357X>>. Acesso em: 4 abr.  
280 2011.
- 281 RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. *Exame Clínico e Diagnóstico*  
282 *em Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2002. 604p.
- 283 REBHUN, W. C. *Doenças do gado leiteiro*. São Paulo: Editora Roca, 2000. 646p.
- 284 RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR., W;  
285 GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre a  
286 mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na  
287 região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*. v.9, n.3, p.287-290,  
288 2003.
- 289 RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.;;  
290 SALERNO, T.; FERNANDES, M. C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos  
291 de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária*  
292 *Brasileira*. v.29, n.1, p.52-58, 2009.

- 293 SANTOS, L. L.; PEDROSO, T. F. F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na  
294 bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia. v.11, n.4, p.860-  
295 866, 2010. Disponível em < [www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/3654/8360](http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/3654/8360)>.  
296 Acessado em 23 jun 2001.
- 297 SCHALM, O. W; NOORLANDER, D. D. Experiments and observation leading to  
298 development of California Mastitics Test. *Journal of the American Veterinary Medical*  
299 *Association*. n.69, p.1708-1720, 1957.
- 300 SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D.  
301 *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on farms differ in coagulase  
302 genotype. *Veterinary Microbiology*. v.92, p.327-334, 2003. Disponível em  
303 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502004091>>. Acessado em 11  
304 ago 2011.
- 305 SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A; FURLANETTO, S.M.P.; ROSSI  
306 JÚNIOR, O.D. Pesquisa de *S. aureus* Enterotoxigênicos em amostras de leite de vacas  
307 mamíticas. *Ars Veterinária*. v.2, n.1, p.69-74, 1986.
- 308 SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R.  
309 F. S.; GOMES, R. A. R. *Staphylococcus aureus*. In: \_\_\_\_\_. *Manual de Métodos de Análise*  
310 *Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2007. p.137-148.
- 311 SILVA, W.P. *Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de Staphylococcus aureus*  
312 *isolados de leite de vacas com mamite subclínica e de outras fontes em propriedades*  
313 *produtoras de leite*. 1998. 98p. Tese (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas) –  
314 Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.
- 315 SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia dos alimentos*. Brasília: Embrapa, 1995. 159p
- 316 TALBOT B.G; LACASSE P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock*  
317 *Production Science*. v.98, n.1-2, p. 101-113, 2005. Disponível em

318 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622605002897>>. Acessado em: 9  
319 abr. 2011.

320 VARALDO, P. E.; KILPPER-BALZ, R.; BIAVASCO, F.; SATTA, G.; SCHLEIFER, K. H.  
321 *Staphylococcus delphini* sp. nov., a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins.  
322 *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.18, n.4, p. 436-439, 1988.

323 VIÇOSA, G. M.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of  
324 coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft  
325 cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the  
326 Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology*. v.27, n.4, p. 447-452, 2010.  
327 Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002009002846>>.  
328 Acessado em: 14 abr. 2011.

329 YAZDANKHAN, S.P.; OLSEN, E. Simple and direct detection of *Staphylococcus aureus* in  
330 milk by a tube coagulase test. *Letters in Applied Microbiology*. v.27. p.111-115, 1998.

## 4.2 Artigo 2

**Infecção intramamária em bovinos por *Staphylococcus aureus*: importância dos fatores de virulência e sua inter-relação**  
**Bandeira, F. S.; Picoli, T.; Zani, J. L., Peter, C. M.; Fischer, G.**  
**Irá ser submetido   revista Ciência Rural**

1 **Infecção intramamária em bovinos por *Staphylococcus aureus*: importância dos fatores**  
2 **de virulência e sua inter-relação**

3 **Resumo**

4 A bactéria *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo de grande importância na saúde  
5 humana e animal. É um patógeno conhecido e bem caracterizado, com uma série de fatores de  
6 virulência que garantem a sua penetração no tecido do hospedeiro, a evasão das respostas  
7 imunes e a formação de um micro ambiente capaz de sobreviver a antimicrobianos muitas  
8 vezes de última geração. Dentre as doenças que acometem os animais de produção estão as  
9 infecções intramamárias, tendo como *S. aureus* o principal micro-organismo causador. Esse  
10 artigo tem por objetivo resgatar informações que contribuem para ajudar a entender o  
11 mecanismo pelo qual o agente consegue ultrapassar as defesas inespecíficas, colonizar  
12 tecidos, estabelecer a infecção e, em muitos casos, perpetuar a doença por longo períodos.  
13 Vários fatores de virulência já foram descritos e são conhecidos, outros ainda hoje são objetos  
14 de discordância sobre a sua atuação e muitos genes com provável regulação no  
15 estabelecimento da infecção ainda precisam de comprovação. Dessa forma, foi dada ênfase a  
16 informações recentes sobre os dados estabelecidos que são objeto de discussão e atualização  
17 dos mecanismos conhecidos, sempre procurando estabelecer uma relação entre atividades que  
18 muitas vezes são apresentadas como tendo funções distintas.

19 Palavras-chave: bap, Fnbp, virulência, mastite.

20 **Intramammary infection in cattle by *Staphylococcus aureus*: importance of virulence**  
21 **factors and their interrelationship**

22 **Abstract**

23 *Staphylococcus aureus* is a microorganism of great importance in human and animal  
24 health. Although it is a known pathogen, with a large number of studies that characterize it,  
25 there are still some virulence factors that ensure their penetration of the host tissue, evasion of

26 immune responses and the formation of an environment to survive the antimicrobial products.  
27 An important disease that affects farm animals are the mammary infections, with *S. aureus* as  
28 a major cause. Associate production of virulence factors of the pathogen, has little knowledge  
29 about the immune defense in the bovine mammary gland. Thus, this review aims to rescue  
30 recent information that contribute to help understand the mechanism by which the agent can  
31 overcome the nonspecific defense, colonize tissues, promoting the disease and, in many cases,  
32 perpetuate the disease for long periods, leading to disposal animal. Several virulence factors  
33 have been described and are known, others are still disagreement objects on his activities and  
34 many genes with likely performance in the establishment of infection still need proof. Thus,  
35 emphasis was given to recent informations, the established data which are subject to  
36 discussion and rescue of known mechanisms, always seeking to establish a relationship  
37 between activities that are often presented as having distinct functions.

38 Key words: *Staphylococcus*, abscess, bap, fnbp, virulence, mastitis.

### 39 **Introdução**

40 As doenças causadas por *S. aureus* em seres humanos, incluindo endocardite, bacteremia,  
41 pneumonia, osteomielite e choque séptico, são as principais causas de morte por infecção nos  
42 EUA, superando o número de mortes atribuídas ao HIV-1, hepatite e gripe combinados  
43 (WANG et al., 2012). Além de representar um importante agente etiológico envolvido em  
44 casos de infecções nosocomiais, é um micro-organismo envolvido em vários casos de doenças  
45 não apenas em humanos (SANTOS, 2004), mas também é um importante agente causador de  
46 infecção primária para várias espécies animais, com comprometimento da pele e mucosas  
47 (ZECCONI & SCALI, 2013). O perigo representado por *S. aureus* deve-se a seus efeitos  
48 deletérios na saúde animal e seu potencial de transmissão de animais para o ser humano e  
49 vice-versa (PETON & LE LOIR, 2014). É um micro-organismo comensal normal da pele em  
50 populações humanas e animais e, embora inócuo nesse local, tem uma grande capacidade de  
51 penetrar, sobreviver e eventualmente se multiplicar em um grande número de células

52 eucarióticas. Além de garantir a sobrevivência do micro-organismo frente a antibióticos, o  
53 micro-organismo se mantém de forma persistente no hospedeiro por um longo tempo, sem  
54 causar inflamação aparente (BARDIAU et al., 2014). Dessa forma, torna-se um agente  
55 patogênico quando consegue atingir e infectar tecidos internos, causando uma série de  
56 processos entre os quais, septicemia e abscessos (VALLE et al., 2012).

57 Nos animais, uma das principais doenças que o micro-organismo causa são as infecções  
58 intramamárias em bovinos, denominadas de mastite. Embora perto de 140 espécies de micro-  
59 organismos possam ser identificados como agentes etiológicos de mastite bovina,  
60 *Streptococci*, coliformes e *Staphylococci* são os mais frequentemente isolados (SWEDA et  
61 al., 2012). *S. aureus* é um dos mais relevantes patógenos que causa mastite clínica, subclínica  
62 ou crônica (BAR-GAL et al., 2015), sendo a forma subclínica da doença responde por cerca  
63 de 30% de todos os casos de mastite que ocorrem no mundo (BARDIAU et al., 2014).  
64 Embora o mecanismo molecular exato do estabelecimento da infecção intramamária não  
65 esteja corretamente estabelecido (COELHO et al., 2011), alguns isolados de *S. aureus* são  
66 capazes de causar mastite aguda e clínica com alterações macroscópicas no leite. Outras  
67 vezes, são capazes de estar envolvidas em quadros crônicos e mastite subclínica, sem  
68 promover alterações macroscópicas no leite, mas levando a uma alta contagem de células  
69 somáticas e a persistência das bactérias na glândula mamária (BARDIAU et al., 2014). *S.*  
70 *aureus* é o responsável por mastite contagiosa e tem um grande potencial para desenvolver  
71 resistência para todos os agentes antimicrobianos e tolerar uma grande variedade de respostas  
72 do hospedeiro (WANG et al., 2015). O principal reservatório de *S. aureus* é o quarto  
73 infectado e a transmissão entre as vacas normalmente ocorre durante a ordenha (MOMTAZ et  
74 al., 2010), causando uma doença de difícil cura (LE MARÉCHAL et al., 2011). Essa bactéria  
75 causa grandes problemas econômicos para a produção leiteira, com a redução da produção e  
76 qualidade do leite, prolongado tratamento com antibióticos e descarte precoce dos animais

77 (BARDIAU et al., 2014).

## 78 **Resposta imune na glândula mamária**

79 A maioria dos casos de mastite iniciam quando o micro-organismo consegue superar a  
80 barreira anatômica e física do canal do teto, com a multiplicação bacteriana e o seu  
81 estabelecimento no tecido da glândula mamária, em reflexo a falhas nas defesas inespecíficas  
82 do hospedeiro (WELLNITZ & BRUCKMAIER, 2012).

83 Estudos tem lançado uma nova luz sobre a capacidade da sobrevivência da bactéria em  
84 superfícies muco-cutâneas. Linde et al., (2008) descrevem a importância da lisozima na  
85 proteção da glândula mamária. Porém Garzoni & Keley (2009), citando trabalho de Bera et al.  
86 (2006), atribuem que em consequência da pressão de seleção estabelecida, em todas os  
87 isolados patogênicos de *S. aureus* por eles pesquisadas, foi encontrado a presença do gene  
88 *oatA*. Esse gene codifica para a expressão de O-acetiltransferase, capaz de conferir resistência  
89 a lisozima. Dessa forma, percebe-se que a patogenicidade do micro-organismo não está  
90 direcionada apenas aos fatores ligados as respostas celulares e humorais complexas.

91 As células fagocitárias profissionais, como neutrófilos e macrófagos são especializadas  
92 em engolfar micro-organismos e remover debris celulares através da captação endocítica  
93 dessas estruturas (GARZONI & KELLEY, 2009). A mais eficiente defesa natural contra a  
94 infecção na glândula mamária por *S. aureus* é a fagocitose por neutrófilos. Mesmo em  
95 condições fisiológicas normais, a fagocitose está comprometida devido a ingestão por  
96 neutrófilos de glóbulos de gordura e caseína do leite, levando a uma deficiente opsonização  
97 (PELLEGRINO et al., 2010).

98 Uma alternativa no combate a infecção seria o aumento de anticorpos opsonizantes nas  
99 secreções lácteas, tornando potencializada a eficiência de neutrófilos e reduzindo o número  
100 necessário dessas células para proteção da glândula mamária às infecções. Adicionalmente,  
101 IgG<sub>2</sub> é reconhecido em bovinos como o anticorpo opsonizante na promoção da fagocitose por

102 neutrófilos. Assim, uma vacina que aumente a fagocitose dos neutrófilos pela estimulação na  
103 produção de anticorpos opsonizantes contra *S. aureus* parece ser uma ferramenta valiosa na  
104 prevenção das infecções intramamárias (IMI) contra esse micro-organismo.

105 Com relação ao processo de cronicidade da mastite por *S. aureus*, várias hipóteses tem  
106 sido apontadas, entre as quais estão a formação de biofilme, a invasão tecidual e a  
107 citotoxicidade do micro-organismo (PETON et al., 2014). Foi observado que os isolados que  
108 secretam altos níveis de leucocidina Panton-Valentine e  $\alpha$ -toxina, estão associados com  
109 mastites severas mas não persistentes, ao contrário de *S. aureus* com níveis baixos de  
110 toxicidade que parecem favorecer infecções persistentes (PETON et al., 2014).

111 Após a invasão tecidual, *S. aureus* permanece de forma extracelular, nos espaço  
112 intersticial entre as células, mas na presença de compostos de defesa do sistema imune inato,  
113 contendo elementos celulares, humorais e sistema complemento, momento em que ocorre a  
114 produção de fatores de virulência que medeiam a adesão celular e tecidual, representado pelas  
115 proteínas de superfície (VALLE et al., 2012).

116 Quando as defesas ligadas a imunidade inata apresentam falhas, o micro-organismo  
117 apresenta vários outros fatores que facilitam a sua ligação ao tecido animal e permanência no  
118 local da infecção (SAEI, 2012). A certeza de que a bactéria não será eliminada da glândula  
119 durante o processo de ordenha, caracteriza o quadro de uma doença invasiva (SAEI, 2012). O  
120 micro-organismo pode expressar uma série de proteínas em sua superfície que desempenham  
121 um papel importante como fatores de virulência, atuando no processo de adesão às células do  
122 tecido hospedeiro (CHEN et al., 2013) e constituindo-se o primeiro passo para a colonização  
123 da glândula mamária (PRENAFETA et al., 2010; COELHO, 2011). *S. aureus* produz  
124 substâncias que contribuem para o dano tecidual e evasão, como proteases, DNase, lipase e  
125 toxinas e substâncias que o protegem da defesa imunológica do hospedeiro, como os  
126 superantígenos (VALLE et al., 2012). Assim, a pesquisa dos fatores de virulência da bactéria

127 fornece informações importantes para o estabelecimento de estratégias para o controle da  
128 infecção (SAEI, 2010).

129 O estudo das moléculas de adesão pode ajudar a esclarecer o seu papel nas infecções  
130 intramamárias, e entre as proteínas de superfície produzidas por *S. aureus* existe um grupo  
131 diverso de adesinas capazes de se ligar a proteínas presentes na matriz extracelular das células  
132 hospedeiras (SAEI, 2010). Muitas das proteínas de superfície de *S. aureus* são ligadas por  
133 sortase “A”, uma transpeptidase responsável por catalisar o ancoramento covalente de  
134 proteínas de superfície de bactérias gram-positivas na parede celular (CASCIOFERRO et al.,  
135 2014). Proteína “A” e os fatores *clumping* A e B (ClfA e ClfB), são caracterizados por uma  
136 sequência N-terminal para secreção de Sec-dependente, e C-terminal é um domínio para  
137 ancoragem na célula por ligação covalente a parede celular pela sortase “A” (CORRIGAN et  
138 al., 2007).

139 As proteínas ligantes de fibronectina (*fibronectin-binding proteins*) pertencem à família  
140 de componentes microbianos que reconhecem moléculas de superfície de matriz adesiva  
141 (MSCRAMMs) e são ligados por sortase “A” (CHEN et al, 2013). *S. aureus* pode expressar  
142 duas FnBPs através de dois genes relacionados, que são o *fnbA* e *fnbB* (HOFFMANN;  
143 OHLSEN; HAUCK, 2011). Tanto *fnbA* quanto *fnbB* possuem uma estrutura idêntica a um  
144 peptídeo de sinal na extremidade amino terminal e uma sequência LPXTG ligada  
145 covalentemente ao peptidoglicano da parede celular (HOFFMANN et al., 2011). São  
146 moléculas que apresentam um papel principal na adesão e invasão das células da glândula  
147 mamária, influenciando a patogênese da mastite bovina (CHEN et al, 2013). A capacidade do  
148 micro-organismo de ser internalizado em células fagocíticas não profissionais é demonstrada  
149 em cultivos celulares como sendo de responsabilidade de FnBP na bactéria e integrinas nas  
150 células hospedeiras (HOFFMANN et al., 2011; GARZONI e KELLEY, 2009).

151 Vários estudos têm tentado esclarecer como as integrinas de ligação da matriz

152 extracelular são transformados em receptores de endocitose para FnBPs de *S. aureus*  
153 (HOFFMANN et al., 2011). Tem sido demonstrado que a associação entre os ligantes de  
154 fibronectina de *S. aureus* com as integrinas  $\beta 1$  da célula hospedeira leva a um agrupamento e  
155 ativação das integrinas, desencadeando na célula hospedeira, uma rota de sinalização e  
156 acúmulo de um complexo de proteínas de adesão na proximidade para ligação do micro-  
157 organismo (HOFFMANN et al., 2011). Várias proteínas associadas a integrinas como  
158 vinculina, paxilina, zyxin, angiotensina, FAK e c-Src são atraídas pela ligação do *S. aureus* a  
159 célula hospedeira, culminando com a reorganização do citoesqueleto (HOFFMANN et al.,  
160 2011). Segundo GARZONI e KELLEY (2009), durante o processo de invasão tecidual  
161 predomina o papel da FnBPs, mas também apontam que proteína A e SCCmec são  
162 fundamentais na internalização bacteriana. A proteína A sempre foi conhecida pela sua  
163 capacidade de ligação a imunoglobulinas, permitindo a evasão de *S. aureus* da resposta imune  
164 e promovendo aderência multicelular (GARNETT & MATTHEWS, 2012). Já o termo  
165 SCCmec designa um elemento genético móvel, com tamanho variando entre 21 e 67 kb e  
166 encontrado exclusivamente no gênero *Staphylococcus* spp. (NAMVAR et al., 2014), até então  
167 relacionada com a resistência bacteriana a meticilina.

168 As adesinas são consideradas os mais importantes fatores de virulência durante os  
169 primeiros momentos da infecção por *S. aureus* (ZHOU et al., 2006). A adesina de colágeno,  
170 como o próprio nome indica, é a proteína de adesão responsável pela habilidade da bactéria se  
171 ligar a colágeno, seja na forma de substrato ou tecidos contendo essa substância, destacando a  
172 sua contribuição em algumas condições patológicas, como ceratite ocular, osteomielite e  
173 artrite séptica (SAEI, 2010). Embora o gene *cna*, que codifica essa proteína, esteja presente  
174 em isolados envolvidos em casos de mastite (ZECCONI et al., 2006), o papel da adesina de  
175 colágeno na virulência de *S. aureus* durante a infecção intramamária não está esclarecido de  
176 forma definitiva (SAEI, 2010).

177 Na literatura são descritos, ainda, outros fatores relacionados a aderência de *S. aureus* e  
178 sua importância na infecção intramamária, alguns já conhecidos, como a coagulase (CHENG  
179 et al., 2010; COELHO et al., 2011; GÜLER et al., 2005; OVIEDO-BOYSO et al., 2007),  
180 hemolisina e *slime* (COELHO, 2011). Além desses, a produção de exotoxinas e enzimas que  
181 causam uma variedade de infecções na pele e tecidos moles e já caracterizadas como tendo  
182 participação em infecções intramamárias (DELGADO et al., 2011). Nesse contexto, ainda é  
183 atribuído a alfa-hemolisina e acoagulase, mas não a proteína “A”, os fatores chave para  
184 indução de mastite em camundongo (CHEN et al., 2013). Mesmo fatores já estabelecidos têm  
185 merecido considerações, como a informação de Bardiau et al. (2014) que a ausência de  
186 expressão da cápsula polissacarídica aumentou a aderência e a invasão de células endoteliais e  
187 epiteliais por *S. aureus*. Adicionalmente, as cepas caracterizadas como cápsula negativa,  
188 mostraram capacidade de induzir mastite crônica experimental em camundongos, sugerindo  
189 que a perda da expressão de cápsula pode aumentar a persistência de *S. aureus* na glândula  
190 mamária.

191 Existem fatores de virulência adicionais que são codificados por genes presentes na  
192 bactéria, mas ainda não é conhecida sua correta atuação e ainda existem fatores descritos nas  
193 pesquisas em outras áreas, mas que não têm como foco a infecção na glândula mamária.  
194 Entretanto, é provável que o comportamento da bactéria seja o mesmo em vários tecidos do  
195 hospedeiro.

196 O curso, muitas vezes prolongado e frequentes recaídas de infecções graves, tem sido  
197 atribuído a localização intracelular de *S. aureus* (SINHA & FRAUNHOLZ, 2010), pois uma  
198 importante característica desse agente é a capacidade de invadir células e sobreviver  
199 intracelularmente por longos períodos de tempo. A identificação de características de  
200 *Staphylococcus* que o associam a infecção duradoura é de grande importância (BARDIAU et  
201 al., 2014), pois instiga os pesquisadores a provar que essa forma de localização contribui para

202 a infecção persistente, colaborando para desenvolvimento de medidas eficazes e protocolos  
203 para tratamento com antibióticos de forma adequada, afim de combater bactérias  
204 intracelulares.

205 A aderência e fixação de *S. aureus* nas superfícies biológicas representa o passo inicial  
206 para o desenvolvimento de infecções, mas a produção de *slime* assegura a adesão para que a  
207 bactéria consiga ter acesso as células de defesa do hospedeiro (COELHO et al., 2011).

## 208 **Biofilme**

209 O biofilme é uma matriz polimérica extracelular constituído de exopolissacarídeos,  
210 proteínas e DNA (VALLE et al., 2012). É apontado, ainda, por Valle et al. (2012) que sua  
211 produção ocorre após a ligação entre a bactéria e a célula hospedeira, sendo o resultado da  
212 adesão intercelular de células bacterianas, com ocorrência tanto em superfícies inertes quanto  
213 em tecidos vivos (DI CICCIO et al., 2015). Lee et al. (2014), pesquisaram a capacidade de  
214 produção de biofilme a partir de *S. aureus* isolados de casos de mastite subclínica, tanque de  
215 refrigeração de leite, mão de ordenhadores e superfícies de máquinas e utensílios. Esses  
216 pesquisadores identificaram a formação biofilme nas superfícies de poliestireno, borracha e  
217 aço, não ocorrendo apenas na superfície de silicone, dentre os materiais pesquisados.

218 A produção de biofilme é um processo mediado pela proteína Bap (proteína associada ao  
219 biofilme) e ocorre tanto na presença quanto na ausência do exopolissacarídeo PNAG (VALLE  
220 et al., 2012). Isolados de *S. aureus* produtoras de Bap mostram uma capacidade mais  
221 aprimorada de colonizar e persistir na glândula mamária, embora o mecanismo molecular  
222 responsável por essa interação permaneça desconhecido (VALLE et al., 2012).

223 A formação de biofilme ocorre em duas fases, sendo uma inicial caracterizada pela  
224 multiplicação bacteriana, mediada por ácido teicóico e exoproteínas do MSCRAMM e Bap  
225 (SNEL et al., 2014). Estudos de Valle et al. (2012) mostraram que Bap melhora a aderência,  
226 mas inibe a entrada de *S. aureus* na célula epitelial, descrevendo assim, que existe uma

227 relação direta entre Bap e Gp96, que é responsável pela inibição da invasão bacteriana em  
228 células fagocitárias, pela interferência com a internalização mediada pela proteína ligante de  
229 fibronectina, revelando um novo papel da matriz do biofilme durante o estabelecimento de  
230 infecções persistentes. A outra fase, chamada acúmulo, caracteriza-se pela proliferação  
231 bacteriana em várias camadas de matriz polimérica extracelular (SNEL et al., 2014).

232 Segundo Valle et al. (2012), a presença de matriz de biofilme mediada por Bap, interfere  
233 na ligação de algumas adesinas de *S. aureus*, como a proteína ligante de fibronectina e fator  
234 *clumping* em seus destinos, como fibronectina e fibrinogênio nos tecidos dos hospedeiros.

235 Proteínas funcionalmente homólogas a Bap, estão presentes em muitas bactérias  
236 filogeneticamente não relacionadas como *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*,  
237 *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus reuteri*, *Bordetella pertussis* e *Escherichia coli*  
238 (VALLE et al., 2012).

239 Atribui-se à capacidade de produzir biofilme por *S. aureus*, a resistência a fagocitose pelo  
240 impedimento da resposta imune, atenuação da resposta pro-inflamatória do hospedeiro  
241 (VALLE et al., 2012) e dificuldade da ação de antibióticos, assegurando a persistente  
242 colonização da bactéria extracelularmente (BARDIAU, 2014).

243 Além do papel de proteção, é provável que a matriz do biofilme possa atuar como um  
244 importante antígeno de superfície bacteriano e, nesse contexto, a interação entre a bactéria  
245 dentro do biofilme e o hospedeiro pode depender de uma ligação específica de componentes  
246 da matriz extracelular do biofilme, a componentes dos receptores do hospedeiro (VALLE et  
247 al., 2012), transformando o biofilme em si em um fator de virulência no gênero  
248 *Staphylococcus*. As evidências propostas mostram que o biofilme não é apenas um fator de  
249 virulência associado a mastite estafilócica (DELGADO et al, 2011), uma vez que *S. aureus*  
250 está localizado principalmente em aglomerados dentro dos ductos mamários, em associação  
251 com células epiteliais (TANJI et al., 2015). O biofilme atua também como um elemento de

252 importância na persistência de mastite (TREMBLAY et al., 2013), resultando em uma  
253 consequente infecção crônica (PRENAFETA et al., 2010). Essa hipótese é sustentada em  
254 partes, pelo fato de existir uma correlação negativa entre os resultados satisfatórios de  
255 antibiogramas que não refletem o sucesso quando realizada a terapia a campo (SNEL et al.,  
256 2014).

257 Todas as espécies em que o gene *Bap* esteja presente são fortes produtoras de biofilme  
258 (VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004), e embora a presença do gene  
259 *bap* seja amplamente difundida em estafilococos coagulase negativa, raramente é encontrado  
260 em *S. aureus* (SNEL et al., 2014). A formação de biofilme pelas espécies de *Staphylococcus*  
261 está associada com uma série de fatores, como o *locus* de adesão intercelular (*icaABCD*)  
262 (SEIXAS et al., 2014). Esse *locus*, codifica as proteínas responsáveis pela síntese de  
263 compostos da matriz exopolissacarídica, como poly-N-acetil-beta-(1-6) glicosamina (PNAG),  
264 e proteínas de superfície como a proteína associada ao biofilme Bap, a proteína associada ao  
265 acúmulo Aap, a adesina de fibrinogênio, a adesina de fibrinectina FnBP, SasG, Proteína  
266 “A”, e a bifuncional adesina e autolisina AttE (A. GARNETT & MATTHEWS, 2012;  
267 TREMBLAY et al., 2013; VALLE et al., 2012). A proteína de superfície G (SasG) é uma  
268 proteína ancorada na parede celular envolvida com a auto-agregação intercelular de *S. aureus*,  
269 embora o alvo para sua ligação ainda não tenha sido identificado (TANJI et al., 2015).

270 Modulinas fenol-solúveis (PSMs) são peptídeos surfactantes secretados pela matriz do  
271 biofilme de *S. aureus* que atua como um fator estruturante do biofilme (VALLE et al., 2012),  
272 que além de apresentarem múltiplas funções na evasão do sistema imune, também possuem  
273 atividades pró-inflamatórias e propriedades antimicrobianas (LAABEI et al., 2014b).

274 As PSMs são uma família de peptídeos  $\alpha$ -hélice anfipáticos, encontrados em  
275 *Staphylococci* (OTTO, 2014) classificadas em dois grupos, sendo a classe alfa (PSM $\alpha$ )  
276 constituído de quatro peptídeos com cerca de 20 aminoácidos e o grupo  $\beta$  (PSM $\beta$ ),

277 constituído de dois peptídeos mais longos, com cerca de 40 aminoácidos (LAABEI et al.,  
278 2014a). Segundo Laabei et al. (2014a), as PSM $\alpha$  são apontadas como cruciais para mediar a  
279 evasão do fagolisossoma tanto em células fagocitárias profissionais como não profissionais,  
280 constituindo-se num importante mecanismo de migração e disseminação nas células do  
281 sistema imune. Ao que tudo indica, a função das PSMs está direcionada a colonização da  
282 superfície celular, embora assim como uma série de outros fatores de virulência expresso por  
283 *S. aureus*, possam ter atividades em mais de uma situação. Otto (2014a) aponta que a  
284 característica anfipática da  $\alpha$ -hélice, é um local de produção de substâncias com  
285 características surfactantes, que facilita o crescimento do micro-organismo em ambientes com  
286 interface óleo/água, como acontece na pele. Esse mesmo autor, descreve que a regulação das  
287 PSMs ocorre diretamente pelo gene *agr*, ao contrário de muitas outras toxinas que são  
288 codificadas por elementos genéticos móveis. Além desses dois pontos, é citado que  
289 adicionalmente as PSMs colaboram para a disseminação do micro-organismo na superfície,  
290 além de participar do biofilme.

### 291 **Formação de abcesso**

292 A característica de cronicidade do processo desencadeado por *S. aureus* na glândula  
293 mamária pode estar relacionada ao conhecido fato de que, após entrar na corrente circulatória  
294 do hospedeiro, a bactéria se dissemina nos tecidos e tem uma grande habilidade para  
295 formação de abscessos (CHENG et al., 2010). O termo abcesso é definido como uma resposta  
296 localizada e padrão do organismo humano ou animal, para uma injúria de natureza química,  
297 física ou biológica, em que ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em  
298 atração de macrófagos e polimorfonucleares (GORBACH, 1995). Embora a função  
299 fisiológico da formação do abcesso seja a delimitação do local para evitar a disseminação da  
300 causa, CHENG et al. (2009) afirmam que, em casos de infecções por *S. aureus*, o hospedeiro  
301 não consegue ter êxito com a delimitação local estabelecida.

302 Após a evasão da resposta imune e sobrevivência do micro-organismo descrito  
303 anteriormente, o tempo estimado para que *S. aureus* chegue ao local onde formará o abscesso  
304 em modelos murinos, foi descrito por CHENG et al. (2011) como sendo aproximadamente de  
305 três horas após a inoculação de cultivo bacteriano. Histologicamente, segundo descrito por  
306 esses mesmos autores, o efeito só foi demonstrado após 48 horas em experimento induzido,  
307 com inoculação de cultura do micro-organismo, sem no entanto a divulgação da carga  
308 microbiana utilizada.

309 Na formação do abscesso, ocorre multiplicação bacteriana com formação de uma  
310 comunidade de micro-organismos no centro dessa lesão, separada das células imunes  
311 infiltradas por uma pseudo-cápsula amorfa, separando o agente patogênico das defesas  
312 imunes do hospedeiro (CHENG et al., 2010). Embora *S. aureus* seja o principal causador de  
313 abscessos mamários, o mecanismo de patogenicidade ainda é pouco estudado (CHEN et al.,  
314 2013). GONG et al. (2014), em experimento para verificar a formação de abscessos  
315 intracranial em modelo murino, atribui a  $\alpha$ -toxina, que é regulada pelo RNA III, possa estar  
316 diretamente relacionada a formação de abscessos.

317 É atribuída a coagulase um papel primordial na formação do abscesso, através de sua  
318 associação com protrombina, clivando o fibrinogênio em peptídeos de fibrina (CHENG et al.,  
319 2011). Entretanto, a descoberta do fator ligado a proteína von Willebrand, trouxe a  
320 informação de que ele é a peça chave para recrutar as plaquetas do sangue, promovendo a  
321 coagulação (KROH; PANIZZI; BOCK, 2009). Assim, atribui-se a coagulase e fator  
322 Willebrand a responsabilidade pelos produtos que levam a formação da pseudo-cápsula do  
323 abscesso desenvolvido por *S. aureus* (CHENG et al., 2011).

324 Em casos severos de infecção, *S. aureus* é capaz de induzir a fibrose e formação de  
325 micro-abscesso que protegem a bactéria pela limitação da penetração de antibióticos no local  
326 da infecção (SCHMIDT, 2011). Os micro-abscessos crescem em tamanho, e eventualmente,

327 rompem, permitindo ao patógeno entrar na circulação e se disseminar para tecidos não  
328 infectados (CHENG et al., 2010).

329 Estudos prévios identificaram proteínas de superfície ancoradas em células da parede,  
330 como por exemplo, IsdA e IsdB, que permitem a captação de ferro de hemoproteínas, AdsA e  
331 proteína “A”, que suprimem a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para formação de  
332 abscesso e sobrevivência de *Staphylococcus* spp. em tecidos infectados (CHENG et al., 2010).  
333 Esses mesmos pesquisadores observaram que quando foram utilizados anticorpos contra IsdA  
334 e IsdB, houve proteção contra a replicação de *S. aureus* em tecidos infectados e redução na  
335 incidência de formação de abscessos.

336 Ao contrário da tradicional definição de abscesso e do seu papel como mecanismo de  
337 proteção do tecido hospedeiro, os abscessos formados por *S. aureus* são lesões dinâmicas,  
338 capazes de secretar substâncias que modulam a resposta imune (ANDERSON et al., 2011).

### 339 **Conclusão**

340 O entendimento da imunidade na glândula mamária é um enorme desafio, pois, em  
341 ruminantes, o tráfego de linfócitos é compartilhado com o sistema imune periférico, e não  
342 com o sistema imune comum a mucosa (SCHUKKEN et al., 2011). *S. aureus* apresenta uma  
343 série de fatores de virulência que atuam tanto de forma isolada como, na maioria das vezes,  
344 apresentando mais de uma função para cada substância produzida para conseguir penetrar nas  
345 células do hospedeiro e perpetuar nesse local, tendo êxito na infecção, refletindo em processos  
346 de mastite crônica com consequentes prejuízos ao produtor.

347 A busca por uma imunidade protetora contra doenças invasivas causadas por *S. aureus*  
348 tem sido constante desde a descoberta do micro-organismo, mas sem sucesso pois nem  
349 mesmo uma vacina estafilocócica eficiente está disponível (CHENG et al., 2010). Não há  
350 dúvida de que *S. aureus* possui uma diversidade de mecanismos de sobrevivência, e  
351 certamente, novas estratégias ainda serão descobertas (GARZONI e KELEY, 2009).

352 **Referências**

353

354 ALMEIDA, A. et al. Detection and discrimination of common bovine mastitis-causing  
355 streptococci. **Veterinary microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 370–7, 28 jun. 2013.

356 ANDERSON, M. et al. EsaD, a secretion factor for the Ess pathway in *Staphylococcus*  
357 *aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1583–9, abr. 2011.

358 ASHRY, E. S. H. EL; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v.  
359 31, n. 1, p. 31–9, 17 dez. 2012.

360 BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in  
361 chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2000.

362 BARDIAU, M. et al. Associations between properties linked with persistence in a collection  
363 of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 169, n.  
364 1-2, p. 74–9, 21 fev. 2014.

365 BAR-GAL, G. K. et al. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary  
366 infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. **Veterinary**  
367 **microbiology**, 14 jan. 2015.

368 BIDDLE, M. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycoplasma* isolates from  
369 various body sites in dairy cattle with *Mycoplasma mastitis*. **Journal of the American**  
370 **Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 3, p. 455–459, 20 ago. 2005.

371 BRADLEY, A. J. et al. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using  
372 different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. **Journal of**  
373 **dairy science**, 18 dez. 2014.

374 CAMUSSONE, C. M. et al. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5  
375 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. **Research in**  
376 **veterinary science**, v. 96, n. 1, p. 86–94, fev. 2014.

377 CASCIOFERRO, S.; TOTSIKA, M.; SCHILLACI, D. Sortase A: an ideal target for anti-  
378 virulence drug development. **Microbial pathogenesis**, v. 77, p. 105–12, dez. 2014.

379 CHEN, F. et al. Role of sortase A in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*-induced  
380 mastitis in mice. **FEMS microbiology letters**, 12 dez. 2013.

381 CHENG, A. G. et al. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and  
382 persistence in host tissues. **FASEB journal : official publication of the Federation of**  
383 **American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 10, p. 3393–404, 1 out. 2009.

384 CHENG, A. G. et al. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and  
385 protective immunity. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 8, p. e1001036, jan. 2010.

- 386 CHENG, A. G. et al. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. **Trends in**  
387 **microbiology**, v. 19, n. 5, p. 225–32, maio 2011.
- 388 CHINCHALI, J. F.; KALIWAL, B. B. Histopathology of mammary gland in Staphylococcus  
389 aureus induced mastitis in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S320–  
390 S325, 2014.
- 391 COELHO, S. M. O. et al. Short communication: profile of virulence factors of  
392 Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro,  
393 Brazil. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3305–10, 7 jul. 2011.
- 394 CORRIGAN, R. M. et al. The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in  
395 adherence and biofilm formation. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n. Pt 8, p.  
396 2435–46, 1 ago. 2007.
- 397 COTTICA, S. M. et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-  
398 step sequential extraction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 609–614,  
399 jan. 2015.
- 400 DE VliegHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease,  
401 potential impact, prevention, and control. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1025–40,  
402 mar. 2012.
- 403 DELGADO, S. et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains involved in human  
404 and bovine mastitis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 62, n. 2, p. 225–35,  
405 jul. 2011.
- 406 DETILLEUX, J.; KASTELIC, J. P.; BARKEMA, H. W. Mediation analysis to estimate direct  
407 and indirect milk losses due to clinical mastitis in dairy cattle. **Preventive Veterinary**  
408 **Medicine**, jan. 2015.
- 409 DI CICCIO, P. et al. Biofilm formation by Staphylococcus aureus on food contact surfaces:  
410 Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930–  
411 936, abr. 2015.
- 412 FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and  
413 cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250–6, 26 jan.  
414 2007a.
- 415 FISCHER, G. et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of  
416 bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary immunology and**  
417 **immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 79–84, 15 mar. 2007b.
- 418 FONSECA, I. et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle.  
419 **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 4, p. 776–81, out. 2009.
- 420 GARNETT, J.; MATTHEWS, S. Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural  
421 Perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 739–755, 1 dez. 2012.

- 422 GARZONI, C.; KELLEY, W. L. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular  
423 persistence. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59–65, fev. 2009.
- 424 GONÇALVES, J. L. et al. Identification of Corynebacterium spp. isolated from bovine  
425 intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass  
426 spectrometry. **Veterinary microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 147–51, 17 set. 2014.
- 427 GONG, J. et al. The accessory gene regulator (agr) controls Staphylococcus aureus virulence  
428 in a murine intracranial abscesses model. **The Brazilian journal of infectious diseases : an  
429 official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 501–6,  
430 jan. 2014.
- 431 GORBACH, S. L. Good and laudable pus. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 6,  
432 p. 2545, 1 dez. 1995.
- 433 GÜLER, L. et al. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus  
434 aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. **Journal of dairy science**, v. 88,  
435 n. 9, p. 3149–54, 9 set. 2005.
- 436 HELMBY, H.; GRENCIS, R. K. Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-  
437 mediated immunity. **European journal of immunology**, v. 34, n. 12, p. 3674–81, dez. 2004.
- 438 HOFFMANN, C.; OHLSEN, K.; HAUCK, C. R. Integrin-mediated uptake of fibronectin-  
439 binding bacteria. **European journal of cell biology**, v. 90, n. 11, p. 891–6, nov. 2011.
- 440 HOGEVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new  
441 developments. **New Zealand veterinary journal**, v. 59, n. 1, p. 16–23, 2 jan. 2011.
- 442 HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting  
443 from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-4, p. 1–20,  
444 dez. 1998.
- 445 HOSSEINZADEH, S.; DASTMALCHI SAEI, H. Staphylococcal species associated with  
446 bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci.  
447 **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27–34, jun. 2014.
- 448 HU, C. et al. Protective effect of ligand-binding domain of fibronectin-binding protein on  
449 mastitis induced by Staphylococcus aureus in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4038–44, 28  
450 maio 2010.
- 451 KROH, H. K.; PANIZZI, P.; BOCK, P. E. Von Willebrand factor-binding protein is a  
452 hysteretic conformational activator of prothrombin. **Proceedings of the National Academy  
453 of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 19, p. 7786–91, 12 maio 2009.
- 454 LAABEI, M. et al. Staphylococcus aureus interaction with phospholipid vesicles--a new  
455 method to accurately determine accessory gene regulator (agr) activity. **PloS one**, v. 9, n. 1, p.  
456 e87270, 30 jan. 2014a.

- 457 LAABEI, M. et al. Investigating the lytic activity and structural properties of *Staphylococcus*  
458 *aureus* phenol soluble modulín (PSM) peptide toxins. **Biochimica et biophysica acta**, v.  
459 1838, n. 12, p. 3153–61, dez. 2014b.
- 460 LE MARÉCHAL, C. et al. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis.  
461 **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27354, jan. 2011.
- 462 LEE, S. H. I. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian  
463 dairy farms. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1812–6, 3 mar. 2014.
- 464 LIMA, K. M. et al. Vaccine adjuvant: it makes the difference. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2374–  
465 9, 23 jun. 2004.
- 466 LINDE, A. et al. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **Journal**  
467 **of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v.  
468 22, n. 2, p. 247–65, jan. 2008.
- 469 LOCATELLI, C. et al. Effect on quarter milk somatic cell count and antimicrobial  
470 susceptibility of *Staphylococcus rostri* causing intramammary infection in dairy water  
471 buffaloes. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 6, p. 3799–805, 6 jun. 2013.
- 472 LOTTI, C. et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of agricultural and**  
473 **food chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209–13, 24 fev. 2010.
- 474 MA, J.; COCCHIARO, J.; LEE, J. C. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus*  
475 strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. **Journal of dairy science**, v. 87,  
476 n. 1, p. 178–82, 1 jan. 2004.
- 477 MA, X. et al. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine  
478 parvovirus vaccine in guinea pig. **Cellular immunology**, v. 270, n. 1, p. 13–8, jan. 2011.
- 479 MEEUSEN, E. N. T. et al. Current status of veterinary vaccines. **Clinical microbiology**  
480 **reviews**, v. 20, n. 3, p. 489–510, table of contents, jul. 2007.
- 481 MOMTAZ, H.; RAHIMI, E.; TAJBAKHS, E. **Detection of some virulence factors**  
482 **in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in**  
483 **Iran** **African Journal of Biotechnology** Academic Journals (Kenya), , 2010. Disponível em:  
484 <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82533>>. Acesso em: 14 fev. 2015
- 485 MOSER, B.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P. CXCR5+ T cells: follicular homing takes  
486 center stage in T-helper-cell responses. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 5, p. 250–254, maio  
487 2002.
- 488 NAKASHIMA, K.-I. et al. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist  
489 from Brazilian green propolis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 10, p. 3034–41,  
490 out. 2014.
- 491 NAMVAR, A. E. et al. Characterisation of SCCmec elements in methicillin-resistant  
492 *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients. **Burns : journal of the International**  
493 **Society for Burn Injuries**, v. 40, n. 4, p. 708–12, jun. 2014.

- 494 OTTO, M. Phenol-soluble modulins. **International journal of medical microbiology :**  
495 **IJMM**, v. 304, n. 2, p. 164–9, mar. 2014.
- 496 OVIEDO-BOYSO, J. et al. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic  
497 bacteria responsible for mastitis. **The Journal of infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409, abr. 2007.
- 498 PELLEGRINO, M. et al. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a  
499 *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 28, p. 4523–8, 17 jun.  
500 2010.
- 501 PEREIRA, U. P. et al. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a  
502 systematic review. **Veterinary microbiology**, v. 148, n. 2-4, p. 117–24, 24 mar. 2011.
- 503 PETON, V. et al. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a  
504 strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary research**, v. 45, n. 1,  
505 p. 106, 14 out. 2014.
- 506 PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, genetics**  
507 **and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in**  
508 **infectious diseases**, v. 21, p. 602–15, jan. 2014.
- 509 PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
510 **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.
- 511 PINTO, M. S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas  
512 do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**  
513 **Science**, v. 38, n. 6, p. 278–283, 2001.
- 514 PRENAFETA, A. et al. Study of the humoral immunological response after vaccination with  
515 a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the  
516 exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus*  
517 induced ma. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 134, n. 3-4, p. 208–17, 15  
518 abr. 2010.
- 519 PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Association between an outbreak strain causing  
520 *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from  
521 Idaho, USA. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 1, p. 66–70, 1 jan. 2010.
- 522 PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis*  
523 mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. **Preventive veterinary**  
524 **medicine**, v. 98, n. 1, p. 74–8, 1 jan. 2011.
- 525 RADAELLI, E. et al. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a  
526 North Italian herd. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 2, p. 251–3, out. 2011.
- 527 RADTKE, A. et al. Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular  
528 epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis.  
529 **Veterinary microbiology**, v. 157, n. 3-4, p. 398–404, 15 jun. 2012.

- 530 ROSSETTI, B. C.; FREY, J.; PILO, P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and  
531 tissue samples by real-time PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 24, n. 5, p. 321–3, out.  
532 2010.
- 533 SALGADO-PABÓN, W.; SCHLIEVERT, P. M. Models matter: the search for an effective  
534 *Staphylococcus aureus* vaccine. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 585–591, 7 jul.  
535 2014.
- 536 SANTOS, N. DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto &**  
537 **Contexto - Enfermagem**, v. 13, n. spe, p. 64–70, 2004.
- 538 SCHMIDT, T. In vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains from  
539 dairy herds in KwaZulu-Natal. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82,  
540 n. 2, p. 76–79, 2011.
- 541 SCHUKKEN, Y. H. et al. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary microbiology**,  
542 v. 134, n. 1-2, p. 9–14, 16 fev. 2009.
- 543 SCHUKKEN, Y. H. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows.  
544 **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 144, n. 3-4, p. 270–89, 15 dez. 2011.
- 545 SEEGER, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and  
546 mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary research**, v. 34, n. 5, p. 475–91, 1 jan.  
547 2003.
- 548 SEIXAS, R. et al. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence  
549 characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in  
550 Portugal. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 1, p. 340–4, 1 jan. 2014.
- 551 SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of**  
552 **ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1–14, 15 ago. 2007.
- 553 SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new  
554 drugs? **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–60, 27 jan. 2011.
- 555 SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion  
556 events. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 2-3, p. 170–5,  
557 fev. 2010.
- 558 SNEL, G. G. M. et al. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and  
559 microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis.  
560 **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 3-4, p. 489–95, 5 dez. 2014.
- 561 STIPKOVITS, L. et al. Short communication: role of *Mycoplasma arginini* in mastitis caused  
562 by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 3, p. 1661–7, 3 mar. 2013.
- 563 SUPRÉ, K. et al. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more  
564 than others. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2329–40, 5 maio 2011.

- 565 SZWEDA, P. et al. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus*  
566 *aureus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1157–74, dez. 2012.
- 567 TANJI, Y. et al. IgG-dependent aggregation of *Staphylococcus aureus* inhibits bacteriophage  
568 attack. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 17–24, maio 2015.
- 569 TREMBLAY, Y. D. N. et al. Characterization of the ability of coagulase-negative  
570 staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of dairy**  
571 **science**, v. 96, n. 1, p. 234–46, 1 jan. 2013.
- 572 VALLE, J. et al. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular  
573 internalization through binding to GP96 host receptor. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 8, p.  
574 e1002843, jan. 2012.
- 575 VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic  
576 screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm  
577 formation and MSCRAMMs. **Veterinary microbiology**, v. 103, n. 3-4, p. 241–7, 15 nov.  
578 2004.
- 579 WANG, D. et al. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile,  
580 resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains  
581 in China. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and**  
582 **evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 31C, p. 9–16, 9 jan. 2015.
- 583 WANG, J.; RODERIQUEZ, G.; NORCROSS, M. A. Control of adaptive immune responses  
584 by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2. **Scientific reports**, v. 2, p. 606,  
585 28 jan. 2012.
- 586 WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M. The innate immune response of the bovine  
587 mammary gland to bacterial infection. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v.  
588 192, n. 2, p. 148–52, maio 2012.
- 589 ZECCONI, A. et al. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the  
590 inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial pathogenesis**, v. 40, n. 4, p.  
591 177–83, abr. 2006.
- 592 ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate  
593 immune defenses in human and animal diseases. **Immunology letters**, v. 150, n. 1-2, p. 12–  
594 22, fev. 2013.
- 595 ZHOU, H. et al. An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated  
596 against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4830–7,  
597 29 maio 2006.

### 4.3 Artigo 3

**Resposta imune em camundongo e bovinos, a uma bacterina com própolis verde como adjuvante, contra a mastite por *Staphylococcus aureus*  
Bandeira, F. S.; Picoli, T.; Zani, J.L; Fischer, G.  
Irà ser submetido à revista Veterinary Research**

1 **Resposta imune em camundongo e bovinos, a uma bacterina com própolis verde**  
2 **como adjuvante, contra a mastite por *Staphylococcus aureus***

3 Resumo

4 Foi avaliada uma bacterina contendo própolis verde como adjuvante, para controle da  
5 mastite por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Outros tratamentos utilizados em bovinos  
6 foram uma bacterina sem própolis, uma vacina comercial e PBS. Um tratamento utilizando  
7 apenas extrato hidroalcoólico de própolis verde foi incluído no experimento em  
8 camundongos BALB/c. Em bovinos, a pesquisa de IgG total mostrou índices que iniciaram  
9 21 dias após a primeira vacinação e se mantiveram sem diferença estatística até o final  
10 do experimento nos grupos que receberam as bacterinas contendo o extrato  
11 hidroalcoólico de própolis e sem própolis, ambas com resultado significativamente  
12 superior ao grupo que recebeu a vacina comercial. A isotipagem demonstrou uma  
13 resposta que teve início com característica humoral e ao longo do experimento passou a  
14 demonstrar comportamento celular. A bacterina contendo extrato hidroalcoólico de  
15 própolis verde estimulou altos níveis de expressão de RNAm para INF- $\gamma$ , IL-2 e CXCR5  
16 em bovinos. Para BALB/c, a pesquisa de níveis de IgG demonstrou aumento aos 42 dias  
17 após a primeira dose dos tratamentos com extrato hidroalcoólico de própolis e a bacterina  
18 sem própolis. A isotipagem demonstrou que os valores de IgG1 foram levemente  
19 superiores aos de IgG2 ao longo do experimento para os tratamentos com extrato  
20 hidroalcoólico de própolis e vacina sem própolis. A vacina comercial mostrou expressão  
21 de RNAm superior aos demais tratamentos para as citocinas pesquisadas. Esses  
22 resultados demonstram que a bacterina contendo extrato hidroalcoólico de própolis verde  
23 é um produto promissor para a espécie a que se destina, no controle da mastite por *S.*  
24 *aureus*.

25 **Palavras-chave:** vacina, própolis verde, imunidade, glândula mamária

26 **Immune response in BALB / c mice and cattle, for the candidate a bacterina for**  
27 **mastitis's control by *Staphylococcus aureus***

28 **Abstract**

29 An bacterin containing propolis was evaluated against intramammary infection by  
30 *Staphylococcus aureus*. Other treatments used in 43 bovinrd were a bacterin without  
31 propolis, a commercial vaccine and sterile PBS. A treatment using alcoholic extract of  
32 green pópolis only was included in the experiment in 30 BALB/c mice. For bovines, the  
33 IgG levels research showed O.D. who started 21 days after the first vaccination and  
34 remained without statistical difference by the end of the experiment, the groups receiving  
35 bacterins containing the hydroalcoholic extract of propolis and without propolis, both with  
36 significantly better result than the group receiving the commercial vaccine. The isotyping  
37 demonstrated a response that began with humoral response and as the experiment went  
38 on to demonstrate cellular behavior. The bacterin containing extract hydroalcoholic of  
39 green propolis stimulated high levels of mRNA expression for IFN- $\gamma$ , IL-2 and CXCR5 in  
40 bovines. For BALB/c, the research showed IgG levels peak at 42 days after the first dose  
41 of treatment with extract hydroalcoholic of green propolis and bacterin without the propolis.  
42 The isotyping showed that the values of O.D. to IgG1 were slightly higher than those of  
43 IgG2 throughout the experiment for treatment with alcoholic extract of propolis and vaccine  
44 without propolis. The commercial vaccine showed mRNA expression higher than others  
45 treatments for the surveyed cytokines. These results show that the bacterin containing  
46 hydroalcoholic extract of green propolis is a promising product for the intended species.

47 Keywords: vaccine, green propolis, mastitis, immunity, mammary gland

48 **Introdução**

49 As infecções intramamárias em bovinos (IIM), ou mastites, são consideradas as  
50 doenças que mais causam prejuízo na produção animal (GONÇALVES et al., 2014;  
51 HOGEVEEN; HUIJPS; LAM, 2011; HORTET; SEEGERS, 1998; HOSSEINZADEH;

52 DASTMALCHI SAEI, 2014; WELLNITZ; BRUCKMAIER, 2012), seja por aspectos  
53 relacionados ao bem estar animal, ou pelas perdas econômicas relacionadas ao  
54 tratamento da enfermidade, a qualidade e volume de leite produzido (SEEGERS;  
55 FOURICHON; BEAUDEAU, 2003). É uma enfermidade com características multifatoriais  
56 (DE VLIEGHER et al., 2012), estimando-se que, aproximadamente, 140 espécies de  
57 micro-organismos possam estar relacionados com a sua etiologia (SZWEDA et al., 2012).  
58 *S. aureus* é o principal micro-organismo causador de IIM (ZECCONI et al., 2006), sendo  
59 responsável pela ocorrência de manifestações clínicas da doença, mas mais  
60 frequentemente de casos subclínicos e, muitas vezes, pelos casos crônicos de difícil  
61 erradicação (CHINCHALI; KALIWAL, 2014).

62 As medidas para prevenção da IIM por *S. aureus* são as mesmas recomendadas para  
63 todas as espécies de micro-organismos potencialmente importantes, envolvendo a  
64 higienização do ambiente de produção e do equipamento utilizado. O tratamento da  
65 doença, entretanto, com o uso de antimicrobianos, tem se mostrado pouco eficiente e  
66 com resultados insatisfatórios (WANG et al., 2015), pela resistência que a bactéria pode  
67 apresentar (CASCIOFERRO et al., 2014). Outro motivo de insucesso da repetição a  
68 campo dos resultados encontrados em antibiogramas realizados nos laboratórios, é a  
69 formação de biofilme pela bactéria, capaz de proteger o micro-organismo não só da  
70 atuação de drogas, mas também da própria resposta imune do hospedeiro (BARDIAU et  
71 al., 2014).

72 A busca por alternativas para prevenção e tratamento da enfermidade passa pelo uso  
73 de vacinas. A vacinação, quando utilizada, é realizada como um complemento as  
74 clássicas medidas de controle já estabelecidas (CAMUSSONE et al., 2014). As principais  
75 críticas às pesquisas sobre vacinação para controle de IIM em bovinos dizem respeito a  
76 sua baixa eficácia a campo, a falta de um protocolo adequado e a presença de dados

77 conflitantes com relação aos resultados obtidos (BRADLEY et al., 2014; KAUF et al.,  
78 2007; TALBOT e LACASSE, 2005)

79 Dentre as alternativas para controle de IIM por *S. aureus*, existem pesquisas  
80 realizadas *in vitro* com o uso de substâncias naturais, como a utilização de própolis  
81 (LOGUÉRCIO et al., 2006; (PINTO et al., 2001) com finalidade bactericida e resultados  
82 satisfatórios. A própolis, entretanto, aparece também em pesquisas com a finalidade de  
83 imunomodulação (FISCHER et al., 2007a; SFORCIN; BANKOVA, 2011; SFORCIN, 2007),  
84 e com a utilização como adjuvante vacinal (ASHRY; AHMAD, 2012; FISCHER et al.,  
85 2007b; MA et al., 2011).

86 A própolis é uma substância resinosa natural produzida por abelhas *Apis mellifera*,  
87 com atividade antimicrobiana sobre um grande número de micro-organismos (SFORCIN;  
88 BANKOVA, 2011), além do potencial como imunoterápico citado anteriormente. Trata-se  
89 de um produto natural com uma composição complexa (COTTICA et al., 2015), em função  
90 das plantas visitadas pelas abelhas e época do ano. Existe mais de um tipo de própolis, e  
91 o chamado própolis verde apresenta uma composição mais uniforme em função das  
92 plantas visitadas e época do ano. A própolis verde é produzida no Brasil a partir da visita  
93 das abelhas a *Araucaria angustifolia*, *Baccharis dracunculifolia* e *Eucalyptus citriodora*  
94 (SFORCIN, 2007), sendo encontrados principalmente compostos fenólicos, como  
95 flavonoides, ácidos aromáticos e diterpenos (BANKOVA et al. (2010); FISCHER et al.,  
96 2010), além de uma grande número de substâncias que exercem uma atividade  
97 combinada, resultando nos principais mecanismos de ação do produto.

98 O objetivo desse trabalho foi analisar as respostas humoral e celular sistêmicas nos  
99 modelos animais bovino e camundongo BALB/c, frente a uma bacterina experimental com  
100 extrato hidroalcolólico de própolis verde em sua composição.

## 102 **Material e métodos**

### 103 I. Própolis

104 A própolis verde utilizada no experimento foi obtida da empresa Apis Nativa e  
105 armazenada a  $-75^{\circ}\text{C}$ . A elaboração do extrato hidroalcoólico ocorreu de acordo com  
106 Paulino et al. (2002), com algumas modificações. De forma resumida, a matéria-prima foi  
107 triturada e hidratada em etanol, passou por processo de rotaevaporação e deu origem ao  
108 extrato hidroalcoólico. Finalmente, o produto foi esterilizado por filtração. A composição  
109 química do extrato hidroalcoólico foi determinada por cromatografia líquida de alta  
110 eficiência (HPLC) em cromatógrafo Merck-Hitachi, equipado com bomba de pressão G-  
111 7100 e detector de arranjo de diodos L-7455. A separação foi realizada em coluna  
112 Lichrochart 125-4 (Merck, Alemanha), conforme descrito por Marcucci et al. (2001), com a  
113 detecção dos componentes monitorizada a 280nm e os compostos padrão re-  
114 cromatografados com o extrato. Os dados foram analisados em equipamento Merck-  
115 Hitachi D-7000 (Chromatography Data Station, DAD Manager).

### 116 II. Elaboração da bacterina

117 As bactérias que integraram a vacina pertencem a bacterioteca da Faculdade de  
118 Veterinária da Universidade Federal de Pelotas e foram isoladas a partir de casos de  
119 mastite clínica no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Foram selecionados três isolados  
120 de *S. aureus*, que foram cultivados em Caldo Trypticase de Soja (Merk – Alemanha),  
121 durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , sendo inativadas ao final do período com o uso de formaldeído  
122 na concentração de 0,6%, durante 18 horas. A concentração usada na bacterina foi de  
123  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Na elaboração da vacina oleosa, a solução de bactérias, acrescida de  
124 solução hidroalcoólica de própolis verde, foi emulsificada em adjuvante oleoso (montanide  
125 ISA 50 V2), resultando numa concentração de própolis de 40 mg.mL<sup>-1</sup>. O volume

126 necessário para completar a concentração desejada foi obtido com o uso de PBS,  
127 segundo Dulbeco.

### 128 III. Grupos vacinais

129 O experimento foi conduzido em duas populações animais: bovinos e camundongos.  
130 Os bovinos foram divididos em quatro grupos, com três inoculações em intervalos de 21  
131 dias, onde ao grupo “bacterina” (n=11) foi administrado a bacterina contendo extrato  
132 hidroalcoólico de própolis verde; ao grupo “positivo” (n=11) foi administrada a vacina  
133 comercialmente disponível; ao grupo “S/prop” (n=10) foi administrado uma formulação  
134 semelhante a bacterina proposta, mas sem a presença de própolis. O grupo “negativo”  
135 (n=11) correspondeu ao controle negativo, tendo recebido apenas a aplicação de PBS.  
136 Todos os animais receberam 2 mL da formulação proposta, por via intramuscular na  
137 região do músculo bíceps femoral caudal, sendo os animais mantidos na Faculdade de  
138 Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, durante o período da pesquisa.

139 Os camundongos BalB/c, foram divididos em cinco grupos e inoculados com três  
140 doses das vacinas experimentais, em intervalos de 21 dias. O grupo “bacterina” (n=6)  
141 recebeu a bacterina contendo extrato hidroalcoólico de própolis verde; ao grupo “positivo”  
142 (n=6) recebeu a vacina comercialmente disponível para bovinos; ao grupo “S/prop” (n=6)  
143 foi administrado uma formulação semelhante a bacterina proposta, mas sem a presença  
144 de própolis; ao grupo “Própolis” (n=6) foi administrada uma formulação semelhante a  
145 bacterina proposta; mas sem a presença de bactérias nem adjuvante oleoso e o grupo  
146 “negativo” (n=6) correspondeu ao controle negativo, recebendo apenas PBS. A dose  
147 utilizada foi de 400 µL por via intramuscular na região do músculo semitendinoso, dividido  
148 em 200µL no membro direito e 200 µL do membro esquerdo. Os animais foram mantidos  
149 durante o experimento em microisoladores, no Biotério Central da Universidade Federal  
150 de Pelotas.

#### 151 IV. Avaliação da Imunidade humoral em bovinos

152 Foram realizadas quatro coletas de sangue por venopunção da veia jugular nos dias  
153 0, 21, 42 e 63 do experimento, em tubos sem anticoagulante. O soro obtido foi  
154 armazenado a -75°C até o momento das análises. A mensuração de anticorpos foi  
155 realizada através da prova de ELISA indireto, baseado em metodologia descrita por  
156 Leitner et al. (2000) com várias modificações. Resumidamente, a placa de 96 cavidades  
157 (COSTAR – USA) foi sensibilizada por 18 horas a 4°C, com 100 µL por cavidade de uma  
158 suspensão bacteriana inativada de *S. aureus* ATCC® 27664, contendo 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.  
159 Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes com PBS adicionado de tween 20  
160 (PBS-T), sendo imediatamente submetidas a bloqueio com leite em pó diluído a 5%, em  
161 volume de 100 µL por cavidade, durante 30 minutos a 37°C. As placas sofreram três  
162 lavagens com PBS-T e foram adicionados os soros sanguíneos bovinos, na diluição  
163 1:1.600 para pesquisa de IgG total. No caso de pesquisa de IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>2a</sub> a diluição de  
164 soro utilizada foi 1:400. Após o período de 90 minutos a 37°C, as placas foram  
165 novamente submetidas a três lavagens e receberam o anticorpo conjugado anti-bovino  
166 (SIGMA – EUA), diluído a 1:20000. No caso de isotipagem, a diluição do anticorpo  
167 conjugado utilizada foi 1:4000, seguida de incubação durante 60 minutos a 37 °C.  
168 Finalmente, as placas foram lavadas por cinco vezes em PBS-T e receberam a  
169 substância de revelação o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD – SIGMA - USA),  
170 sendo mantidas a temperatura ambiente durante 15 minutos para que ocorresse a  
171 revelação. A revelação foi parada com a utilização de 50µL por cavidade de solução de  
172 ácido sulfúrico 2M. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de microplacas TP-  
173 Reader (Thermoplate) utilizando comprimento de onda de 492nm.

176 V. Avaliação da Imunidade humoral em camundongos.

177 Os animais tiveram o sangue coletado através do plexo retro-orbital nos dias 0, 21, 42  
178 e 63 do experimento. O soro obtido foi armazenado a -75°C até o momento das análises.  
179 A mensuração de anticorpos produzidos frente aos antígenos inoculados, foi realizada  
180 através da prova de ELISA indireto, conforme descrito por Leitner et al. (2000), com  
181 algumas modificações. Resumidamente, a placa de 96 cavidades (COSTAR – USA) foi  
182 sensibilizada por 18 horas a 4 °C com 100 µL por cavidade de uma suspensão bacteriana  
183 inativada de *S. aureus* ATCC® 27664, contendo 10<sup>3</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>. Após, as placas foram  
184 lavadas por três vezes com PBS-T, sendo imediatamente submetidas a bloqueio com  
185 solução de leite em pó a 5%, em volume de 100 µL por cavidade, durante 30 minutos a 37  
186 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e foram adicionados  
187 os soros sanguíneos dos camundongos, na diluição 1:200 para pesquisa de IgG. Para  
188 isotipagem, a diluição de soro utilizada foi de 1:100. Após incubação de 90 minutos, as  
189 placas foram novamente submetidas a três lavagens e receberam o anticorpo conjugado  
190 anti-camundongo (SIGMA – USA), diluído a 1:20000 para pesquisa de isotipos de IgG,  
191 sendo incubadas durante 60 minutos a 37 °C. Para a isotipagem o anticorpo secundário  
192 foi utilizado na diluição 1:2000 (SIGMA-USA) sendo incubadas durante 30 minutos a  
193 temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T e  
194 receberam a substância de revelação (OPD - o-Phenylenediamine dihydrochloride -  
195 SIGMA - USA), sendo mantidas a temperatura ambiente durante 15 minutos para que  
196 ocorresse a revelação A revelação foi parada com a utilização de 50µL por cavidade de  
197 solução de ácido sulfúrico 2M. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de  
198 microplacas TP-Reader (Thermoplate) utilizando comprimento de onda de 492nm.

#### 201 IV. Avaliação da Imunidade celular

202 O sangue dos bovinos, coletado com anticoagulante, também foi levado ao  
203 Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas, sendo  
204 centrifugado para a retirada dos leucócitos presentes. Os baços de camundongo foram  
205 levados ao mesmo laboratório e as células foram individualizadas em tamiz (BD-Falcon,  
206 EUA) e ressuspensas em solução de MEM (Meio Essencial Mínimo com sais de Earle e  
207 aminoácidos não essenciais – GIBCO). Tanto para os leucócitos bovinos quanto para os  
208 esplenócitos de camundongos, a metodologia utilizada para seu cultivo foi semelhante e  
209 descritas resumidamente a seguir. As células obtidas foram submetidas a três processos  
210 de lavagem com cloreto de amônia, seguidos de centrifugação a 1300 x g por 10 minutos.  
211 Ao final do processo, houve ressuspensão das células em MEM e contagem em câmara  
212 de Fuchs-Rosenthal, utilizando Azul de Tripán como corante. A quantidade de células foi  
213 padronizada para  $10^7$ .mL<sup>-1</sup> e incubadas em placas de 96 cavidades (TPP-Suíça), em  
214 estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Ao final desse período foi observado o  
215 crescimento celular e realizado o desafio do cultivo usando-se Concanavalina A (Sigma-  
216 Aldrich), MEM e suspensão bacterina de *S. aureus* ATCC® 27664 inativado, passando  
217 por nova incubação a 37 °C e 3,5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Finalmente, as células  
218 foram congeladas em Trizol (Invitrogen) e armazenadas em tubo de criopreservação a -  
219 75° C até o momento das análises.

220 Para avaliação da resposta celular por qRT-PCR, o DNA foi removido com o kit de  
221 amplificação Grade DNase I (Sigma-Aldrich, Brasil) e aproximadamente 1 µg de RNA foi  
222 submetido ao processo de transcrição reversa com o uso do kit High Capacity cDNA  
223 Reverse Transcription (Life Technologies, Brasil), seguindo as orientações do fabricante.  
224 Aproximadamente 500 ng de cDNA foi submetido a qRT-PCR para análise da expressão  
225 relativa de INF-γ, IL-2 e CXCR-5 para bovinos (tabela 1). Para camundongos as citocinas

226 pesquisadas foram IL-1 e IL-4 (tabela 2).  $\beta$ -actina foi usada como gene de referência  
227 endógeno e animais em coleta branca foram usados como calibradores. As reações de  
228 qRT-PCR foram realizadas em um sistema Mx3005P QPCR (Agilent Technologies, EUA),  
229 utilizando SYBR green I Life Technologies, Brasil). Para cálculo da expressão relativa foi  
230 utilizado o método matemático de Pfaffl (2001).

## 231 V. Análise estatística

232 Os dados foram analisados usando o software analítico Statistic 9.0 para Windows. A  
233 análise de diferença na D.O. para o teste ELISA, e análise de expressão relativa dos  
234 genes de interesse no estudo para resposta celular, foi realizada através do teste de  
235 comparação de médias por análise de variância geral ANOVA usando LSD e a  
236 comparação feita em relação aos grupos não tratados.

## 237 **Resultados**

### 238 I. Composição química do extrato de própolis

239 A análise cromatográfica da amostra do extrato hidroalcoólico de própolis verde indicou  
240 a presença de ácido cafeico, ácido fenólico, ácido para-cumárico e artepelin C. Embora a  
241 análise cromatográfica tenha indicado a presença de outras substâncias, as mesmas não  
242 foram identificadas pelo banco de padrões de referência do equipamento.

### 243 II. Resposta humoral em bovinos

244 Foi avaliado o desempenho de uma bacterina contendo óleo, extrato hidroalcoólico de  
245 própolis e isolados de *S. aureus* inativados. Além dessa, foi testada uma formulação com  
246 composição semelhante mas sem o extrato de própolis, chamada S/prop. Como controle  
247 positivo utilizou-se uma vacina comercialmente disponível e, como controle negativo, a  
248 solução de PBS.

249 Não foi observada reação indesejada no local de inoculação nos animais dos grupos  
250 que receberam as formulações propostas nesse estudo.

251 A pesquisa de IgG total em soro sanguíneo bovino apresentou aumento aos 21 dias  
252 nos grupos de animais que receberam tanto a bacterina contendo própolis associado ao  
253 óleo na formulação quanto para o grupo S/prop, composto por óleo como adjuvante sem a  
254 presença do extrato hidroalcolico de própolis ( $p < 0,01$ ), não havendo diferença estatística  
255 significativa entre os dois tratamentos. Os níveis de anticorpos permaneceram alto para  
256 os dois tratamentos nas coletas seguintes até o final do experimento, o que ocorreu aos  
257 63 dias, não havendo diferença estatística entre as três coletas realizadas após a  
258 primovacinação para esses tratamentos (fig. 1). O grupo dos animais que recebeu a  
259 vacina comercial apresentou índices estatisticamente maiores que o grupo controle  
260 negativo ( $p > 0,05$ ), mas permaneceu abaixo dos resultados encontrados na bacterina e  
261 grupo S/prop, permanecendo sem diferença a partir do dia 21 até o final do experimento  
262 para esse tratamento.

263 A isotipagem mostrou aumento de níveis de IgG1 e IgG2a até o dia 63, para a  
264 bacterina e o grupo S/prop. Inicialmente, notou-se predominância de IgG2a, passando por  
265 um equilíbrio entre os dois isotipos, chegando ao dia 63 do experimento com  
266 predominância de IgG1, para os tratamentos bacterina e s/prop. Para a vacina comercial,  
267 o comportamento foi maior de IgG2a em todos os períodos analisados, mas  
268 numericamente inferior aos tratamentos bacterina e s/prop.

### 269 III. Resposta humoral em camundongos BALB/c

270 Percebeu-se a formação de pequenos abscessos no local de administração do produto  
271 comercial em camundongos BALB/c.

272 Os valores de densidade óptica demonstraram aumento progressivo para o tratamento  
273 com bacterina até o dia 42, sendo que no dia 63 demonstrou um leve declínio. Esse  
274 comportamento também foi observado para a formulação S/prop, sendo que ambas  
275 apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos, sem no entanto

276 diferirem entre si. Não houve diferença entre os valores de DO nos dias 42 e 63 para  
277 esses tratamentos quando analisados de forma independente (fig. 4). O produto comercial  
278 e a própolis não apresentaram diferença estatística entre si, sem diferença do controle  
279 negativo.

280 A isotipagem de IgG em soro de camundongos BALB/c apresentou comportamento  
281 semelhante ao demonstrado pelos bovinos. Foi observado um aumento progressivo até o  
282 dia 42 de IgG1 e IgG2a para os grupos testes bacterina e S/prop, percebendo um leve  
283 declínio no dia 63. Tanto para o grupo bacterina, como para o grupo S/prop, houve  
284 predominância de IgG1, a partir do dia 21, sendo observado diferença para o grupo  
285 S/prop do dia 42. Os demais tratamentos não mostraram alteração do comportamento em  
286 relação ao grupo controle negativo (fig. 5).

#### 287 IV. Resposta celular em bovinos

288 O número de transcritos para citocinas nos leucócitos de bovinos foi determinada por  
289 PCR quantitativo nos dias 21, 42 e 63 do experimento. A análise da expressão relativa do  
290 RNAm de INF- $\gamma$  mostrou que no tratamento bacterina, o RNAm foi expresso 13,7 vezes  
291 mais ( $p < 0,001$ ), e no grupo S/prop, a expressão relativa foi 10,7 vezes maior que a  
292 encontrada nos animais em que não houve estímulo vacinal. Não houve diferença entre  
293 os valores dos grupos bacterina e S/prop e ambos os grupos ainda foram estatisticamente  
294 superiores ao tratamento comercial (fig 6a).

295 A expressão relativa de IL-2 demonstrou comportamento semelhante ao INF- $\gamma$ , com o  
296 tratamento bacterina apresentando maior resposta no dia 42 e expressão relativa de 14,7  
297 vezes superior ( $p < 0,001$ ) ao controle negativo (fig 6b). A expressão relativa encontrada  
298 para o tratamento S/prop foi 4,7 vezes maior que os animais que não foram estimulados,  
299 mas estatisticamente esse valor não diferiu do tratamento comercial, embora ambos  
300 tenham sido estatisticamente diferentes do tratamento bacterina.

301 A pesquisa de CxCR-5 demonstrou que o tratamento bacterina no dia 42 apresentou  
302 expressão relativa de 5,7 vezes mais, quando comparado com o controle negativo (fig  
303 6d). Esse resultado ainda apresenta-se estatisticamente superior aos demais tratamentos  
304 para o mesmo dia ( $p < 0,05$ ).

#### 305 V. Resposta celular em camundongos BALB/c

306 O número de transcritos para citocinas em baços de camundongos foi determinado por  
307 PCR quantitativo no dia 63 do experimento. Observou-se que o tratamento usando a  
308 vacina comercial (comercial) foi melhor nas citocinas pesquisadas nessa espécie  
309 ( $p < 0,05$ ), sendo expressa 18,3 vezes mais para IL-1 ( $p < 0,05$ ) e 39 vezes para IL-4  
310 ( $p < 0,01$ ) do que os animais que não receberam vacinação (Fig 6a e 6b). A pesquisa de  
311 IL-4 (Fig 6b) mostrou que o tratamento própolis foi 22 vezes maior ( $p < 0,01$ ), porém sem  
312 diferença em relação ao tratamento comercial.

#### 313 **Discussão**

314 A mastite é uma doença multifatorial e até o momento não existe uma medida  
315 preventiva eficiente, assim como os tratamentos recomendados não são totalmente  
316 eficazes. O desenvolvimento de uma vacina para *S. aureus* é difícil, porque a patogênese  
317 destes organismos é multifacetada (SALGADO-PABÓN; SCHLIEVERT, 2014).

318 Em bovinos, avaliou-se o desempenho de uma bacterina contendo óleo, extrato  
319 hidroalcoólico de própolis e isolados de *S. aureus* inativados. Além dessa, foi testada uma  
320 formulação com composição semelhante mas sem o extrato de própolis, chamada S/prop.  
321 Como controle positivo utilizou-se uma vacina comercialmente disponível, e como controle  
322 negativo solução de PBS esterilizado.

323 Os níveis de IgG total em bovinos foram detectados no dia 21 do experimento e  
324 mantiveram-se, para os tratamentos bacterina e S/prop, sem diferença entre os dias da  
325 pesquisa, mas estatisticamente distintos dos grupos controles positivos e negativos

326 ( $p < 0,001$ ). Esses resultados são diferentes dos encontrados por (PRENAFETA et al.,  
327 2010), que trabalhando com bacterina contendo complexo antigênico associado ao *slime*,  
328 encontraram um pico de produção de anticorpos aos 56 dias do experimento, com  
329 decréscimo para o dia 63, mas com dados estatisticamente superiores ao controle  
330 negativo. Leitner et al. (2003), em um experimento com vacina comercial, observaram que  
331 a maior resposta na produção de anticorpos ocorreu entre a quarta e a quinta semana  
332 após a vacinação, com títulos apresentando decréscimo após esse período. Dessa forma,  
333 tanto a bacterina como a S/prop propostas na pesquisa, mantiveram índices de anticorpos  
334 desde a terceira semana após a primeira dose de vacina até o final do experimento, o que  
335 ocorreu aos 63 dias.

336 O uso de extrato hidroalcolólico de própolis verde na concentração de  $40 \text{ mg.mL}^{-1}$  no  
337 tratamento bacterina, demonstrou que houve diferença significativa em relação ao grupo  
338 controle ( $p < 0,001$ ), a semelhança dos resultados encontrados por Fischer et al. (2007),  
339 utilizando própolis como adjuvante em uma vacina contra herpesvirus bovino tipo 5.  
340 Nossos dados, entretanto, não mostram diferença entre uso de própolis como  
341 coadjuvante (bacterina), em relação ao tratamento que utilizou apenas adjuvante oleoso  
342 (S/prop). Sabendo-se que a própolis provavelmente tenha uma ação sinérgica entre os  
343 seus componentes, talvez a proximidade dos resultados entre os tratamentos bacterina e  
344 S/prop foi devida ao lote de própolis verde utilizado ou alguma divergência no processo de  
345 elaboração do extrato hidroalcolólico, embora a metodologia utilizada tenha sido  
346 semelhante a empregada por FISCHER et al. (2007). Além disso, pode-se atribuir a  
347 diferença entre os antígenos das vacinas e suas particularidades.

348 A isotipagem de IgG em bovinos demonstrou que 21 dias após a primeira dose do  
349 tratamento com a bacterina, houve uma resposta predominantemente de IgG2a, sendo  
350 que esse isotipo equivaleu ao IgG1 aos 42 dias após o início do experimento e duas

351 doses do tratamento bacterina, chegando a terceira coleta no dia 63 e após três doses do  
352 tratamento com predominância de IgG1. O comportamento observado parece concordar  
353 com o exposto por Sforcin (2007), havendo uma imunomodulação pela própolis, iniciando  
354 com uma resposta humoral e aos poucos tendendo a estímulo para resposta celular. No  
355 entanto, esse comportamento foi similar ao demonstrado pelo tratamento S/prop, em que,  
356 as sucessivas aplicações da mesma dose em ambos os tratamentos, refletiu em uma  
357 resposta que inicialmente era de Th2, com características de resposta humoral, chegando  
358 ao final do experimento inclinando-se ao estímulo de resposta celular com o predomínio  
359 de resposta por IgG2a. Entretanto, cabe ressaltar que ambos os tratamentos citados  
360 diferiram do tratamento comercial que apresentou D.O. em menor valor e comportamento  
361 constante de predominância na resposta por Th2 e maior resposta aos 42 dias. Todos os  
362 três tratamentos foram superiores ao tratamento PBS.

363 Para camundongos BALB/c, além dos mesmos tratamentos aplicados aos bovinos,  
364 também foi utilizado 400µL de solução de própolis a 4%. Para controle positivo, utilizou-se  
365 uma vacina comercialmente disponível indicada para controle de mastite em bovinos, com  
366 adequação da dose em função do peso corporal do modelo animal.

367 A pesquisa de IgG total em camundongos BALB/c demonstrou que após duas doses do  
368 tratamento bacterina e S/prop correspondente ao dia 42 do experimento, o valor de D.O.  
369 no ELISA indireto foi superior aos tratamentos anteriores, mantendo-se elevado até o final  
370 do experimento (dia 63), sem diferenças entre esses dois tratamentos e sem diferença  
371 entre essas coletas, porém estatisticamente significativo em relação as coletas anteriores.  
372 Os resultados obtidos estão em concordância parcial com os descritos por Leitner et al.  
373 (2003), que usaram uma formulação de bacterina associada a adjuvante, e observaram  
374 uma elevação no título de anticorpos aos 20 dias, mantendo-se elevado até o final do  
375 experimento que ocorreu aos 90 dias. Ainda nesse experimento, Leitner et al. (2003),

376 observaram que uso de bacterina sem estar associado ao adjuvante, sofreu um aumento  
377 de resposta aos 30 dias, declinando gradualmente até os 60 dias, onde se manteve  
378 constante, porém em todas as coletas sempre esteve inferior ao observado no tratamento  
379 com adjuvante. Neste estudo, observou-se que não houve diferença entre os tratamentos  
380 usando própolis) e o que utilizou o óleo (S/prop.) como adjuvante. Esses resultados  
381 diferem do que Fischer et al. (2007) encontraram em uma pesquisa associando própolis  
382 verde brasileiro a herpesvirus bovino tipo 1, adicionado de hidróxido de alumínio, onde os  
383 camundongos inoculados apresentaram altos títulos de anticorpos. Chu et al. (2006)  
384 também observaram aumento significativo no nível de anticorpos em carpas vacinadas  
385 contra *Aeromonas hydrophila*, contendo própolis como adjuvante, em relação ao grupo  
386 controle sem adjuvante. Deve-se considerar que a própolis é uma mistura complexa de  
387 uma série de componentes, que atuam de forma sinérgica e que variações individuais na  
388 composição, podem resultar em atividades farmacológicas distintas (SFORCIN, 2005).  
389 Assim, é possível que outros compostos estivessem presentes e não foram identificados  
390 na análise cromatográfica, possam estar influenciando na complexa estimulação ou  
391 inibição que a própolis desempenhou. Adicionalmente, deve-se considerar que existem  
392 particularidades ligadas ao antígeno que levaram ao resultado encontrado.

393 O tratamento Própolis não promoveu incremento nos níveis de anticorpos IgG em soro  
394 de camundongos. Isso permite inferir que o comportamento observado na pesquisa indica  
395 que o tratamento bacterina e S/prop. apresentam capacidade de induzir resposta no  
396 modelo animal pesquisado, o que representa um caminho promissor, uma vez que  
397 Pellegrino et al. (2010) recomendam o uso de imunomoduladores para controle de surtos  
398 de mastite por *S. aureus* como uma alternativa ao uso de antibióticos, que podem levar a  
399 aumento da resistência bacteriana na cadeia de produção de alimentos. Finalmente, é  
400 importante ressaltar que o tratamento comercial, no entanto, não apresentou diferença ao

401 longo do experimento, com resultados de D.O. significativamente inferiores aos  
402 tratamentos bacterina e S/prop., comportando-se de forma semelhante aos tratamentos  
403 Própolis e PBS.

404 A isotipagem de IgG em camundongos demonstrou um pico de expressão de IgG1 e  
405 IgG2a no dia 42 do experimento, com leve declínio no dia 63, para os tratamentos  
406 bacterina e S/prop, sendo que ao longo de todas as coletas houve predominância de  
407 IgG1. Não foi observada diferença entre os tratamentos comercial, Própolis e PBS. A  
408 pesquisa com modelo murino indicou que a resposta seria predominantemente humoral.  
409 Chang et al. (2008) relatam que o murino é um modelo adequado para reproduzir as  
410 respostas de bovinos, guardando as diferenças clínicas, porém no presente trabalho essa  
411 relação foi observada na pesquisa de IgG total. Quando é feita a análise de isotipagem,  
412 percebe-se que os resultados são discordantes, o que indica cautela ao se fazer  
413 conclusão quando se utiliza um modelo animal diferente da espécie alvo.

414 A pesquisa da expressão de INF- $\gamma$  em leucócitos de bovinos mostrou que o tratamento  
415 bacterina promoveu uma expressão relativa 13,7 vezes maior que o controle negativo, no  
416 dia 42 do experimento (Fig 6). Nesse mesmo dia, o tratamento S/prop também  
417 apresentou sua maior expressão relativa, que foi 10,7 vezes mais que os animais não  
418 vacinados, embora os animais desse grupo já apresentassem uma expressão elevada  
419 dessa citocina no momento do início do experimento. Houve, ainda, diferença significativa  
420 entre esses dois tratamentos ( $p < 0,01$ ) no dia 42 da pesquisa. Fischer et al. (2007),  
421 trabalhando com diferentes tipos de adjuvantes para uma vacina contra herpesvirus suíno  
422 tipo 1 em camundongos, observou o aumento de INF- $\gamma$  nos esplenócitos dos animais que  
423 receberam a vacina adicionada de própolis, efeito similar ao demonstrado por Sá Nunes  
424 et al. (2003) com cultivos *in vivo* de esplenócitos. A presença de níveis elevados de INF- $\gamma$   
425 é encontrada em função da presença de leucócitos no leite em casos de mastite

426 (FONSECA et al., 2009), sendo que a produção de células Th1 é essencial para que  
427 ocorra a resposta imune celular (FISCHER et al., 2007a). Assim, embora o mecanismo de  
428 atuação exato da própolis ainda não esteja totalmente esclarecido, é inegável que uma  
429 substância que estimula a expressão de citocinas, como INF- $\gamma$ , refletindo em ampliação  
430 da resposta imune, é uma forte candidata a adjuvante vacinal (FISCHER et al., 2007a)

431 A expressão de IL-2 por leucócitos de bovinos no tratamento bacterina foi 14,7 vezes  
432 maior que o controle negativo, e estatisticamente foi o tratamento que mais induziu  
433 expressão. A IL-2, estimula a proliferação e ativação de células mononucleares e o INF- $\gamma$   
434 está associado com a conversão de linfócitos Th0 em Th1, ativação de macrófagos e  
435 neutrófilos (FONSECA et al., 2009). As citocinas expressas pelo tratamento bacterina,  
436 aparentemente induzem em bovinos uma resposta com característica de imunidade  
437 celular.

438 O dia 42, que corresponde ao pico de expressão de IL-2 e INF- $\gamma$  equivale ao momento  
439 em que a isotipagem demonstrou valores equivalente de IgG1 e Ig2a para o tratamento  
440 bacterina, sendo que em uma coleta anterior (dia 21), havia maior valor de D.O. para  
441 IgG2a, e uma coleta após (dia 63), houve valores superiores de IgG1. Dessa forma, os  
442 resultados das citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 associados aos resultados de isotipagem de IgG  
443 permite inferir que houve um equilíbrio entre as respostas imune humoral e celular ao  
444 longo do experimento para o tratamento bacterina em bovinos.

445 A pesquisa da expressão relativa do gene de CXCR5 para o tratamento bacterina,  
446 demonstrou aos 42 dias do experimento um aumento 5,7 vezes maior que a expressão  
447 nos animais não vacinados, tornando-se estatisticamente maior que os demais  
448 tratamentos realizados. CXCR5 é o receptor de quimiocina CXC, que se liga a *B-cell-*  
449 *attracting chemokine 1* (BCA-1 ou CXCL13), produzido no processo de desenvolvimento  
450 folicular da célula T helper (Th), que assegura uma grande qualidade nas respostas

451 imunes celulares (MOSER; SCHAERLI; LOETSCHER, 2002). Revisando-se a literatura,  
452 não é possível encontrar a relação entre a expressão de CXCR5 e os componentes da  
453 própolis, mas os resultados encontrados na pesquisa parecem refletir um comportamento  
454 desejável a uma substância com atividade adjuvante.

455 Houve aumento na expressão de IL-1 para o grupo de camundongos que recebeu a  
456 vacina comercial, sendo sua expressão relativa de 18,3 vezes mais que o grupo que não  
457 foi vacinado, e superior aos demais tratamentos. A IL-1 é uma citocina envolvida em uma  
458 série de eventos ligados a imunidade animal, entre elas a ativação de monócitos e  
459 macrófagos, a potencialização da produção de anticorpos e estimulação de proliferação e  
460 diferenciação de células B em sinergia com IL-4 e IL-6 (HELMBY; GRENCIS, 2004).  
461 Embora seja atribuído ao própolis a capacidade de estímulo a expressão de IL-1 em  
462 murinos (SFORCIN, 2007), os tratamentos da pesquisa em que o própolis estava  
463 presente não demonstraram diferença em relação ao controle negativo. Também Hemby  
464 e Grencis (2004) descrevem que a expressão de IL-1 aparentemente estaria relacionada  
465 a proliferação de alguns clones de Th2 *in vitro*, mas não foi observado essa resposta  
466 nessa pesquisa quando se analisa a fig. 5, onde as respostas de IgG1 em camundongos  
467 foram baixas. Nesse mesmo raciocínio, embora a expressão de IL-1 para os tratamentos  
468 bacterina e S/prop tenha sido baixo, observou-se que a D.O. para IgG1 foi mais alta que o  
469 o grupo tratado com vacina comercial.

470 Para IL-4, o aumento na expressão relativa observado para o tratamento comercial foi  
471 39 vezes. Para essa interleucina, chama a atenção que o grupo que recebeu apenas  
472 própolis apresentou uma expressão relativa 22 vezes superior ao observado nos animais  
473 que não receberam nenhum tratamento, fazendo com não haja diferença estatística em  
474 relação ao grupo tratado com vacina comercial. A IL-4 estimula a diferenciação de  
475 linfócitos Th0 em Th2, induzindo uma resposta humoral (FONSECA et al., 2009), sendo

476 ainda apontada por Hemby e Grecis (2004) como a citocina essencial, junto a IL-1, para  
477 montar a resposta Th2 em camundongos, com estímulo sobre IgE, além de inibir a  
478 resposta Th1 (LIMA et al., 2004). Na pesquisa apresentada, os resultados de IgG2a para  
479 o tratamento S/prop foi ligeiramente superior de IgG1 em relação a IgG2 (Fig. 5), embora  
480 o tratamento comercial não tenha demonstrado o mesmo desempenho na produção de  
481 anticorpos. Sforcin (2007) cita que a própolis teria capacidade de reduzir a expressão de  
482 IL-4 em humanos e juntamente com a redução de IL-2, teria capacidade de regular de  
483 forma negativa tanto resposta Th1 quanto Th2. Porém esse mesmo autor relata que  
484 alguns compostos presentes na própolis, particularmente o CAPE, podem de forma  
485 isolada estimular a produção de IL-4.

486 Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o comportamento da bacterina  
487 que recebeu própolis como coadjuvante, apresentou resposta imune sistêmica  
488 semelhante a bacterina em que o coadjuvante não estava presente, mas com o  
489 tratamento própolis mostrando maior expressão para IL-2 e CXCR5. Ambas tiveram  
490 desempenho superior ao controle negativo (PBS) e ao controle positivo (bacterina  
491 comercialmente disponível). Foi observado que a amostra de própolis verde utilizada  
492 apresentava os principais componentes descritos na literatura como importantes  
493 moduladores da resposta imune. Assim, os resultados demonstram que a própolis verde  
494 da formulação desenvolvida, apresenta potencial para o uso como coadjuvante em uma  
495 vacina para controle da mastite bovina por *S. aureus*, necessitando pequenos ajustes e  
496 um trabalho para verificar sua atuação em condições de exploração leiteira comercial. No  
497 trabalho foi observado que o tratamento bacterina não causou nenhum efeito indesejável  
498 nos modelos animais utilizados, apresentando-se como um produto que pode ser  
499 incorporado a rotina prática de trabalho das propriedades rurais leiteiras. Finalmente,  
500 deve-se ressaltar a importância da execução do experimento no modelo animal a que se

501 destina, pois embora CHANG et al. (2008) considerem o murino um modelo adequado  
502 para reproduzir resposta de bovinos, o experimento em camundongos BALB/c não  
503 refletiu, na prática, a totalidade do comportamento observado em bovinos. Confirmou-se  
504 que os camundongos não mimetizam totalmente as manifestações clínicas observadas  
505 nas infecções (SALGADO-PABÓN; SCHLIEVERT, 2014).

## 506 **Agradecimentos**

507 Os autores agradecem ao apoio da Faculdade de Veterinária, Biotério Central,  
508 Departamento de botânica, Laboratório 4 e Laboratório 9 do Centro de Desenvolvimento  
509 Tecnológico, todos pertencentes a Universidade Federal de Pelotas.

## 510 **Referências**

- 511 Ashry, E. S. H. El, & Ahmad, T. A. (2012). The use of propolis as vaccine's adjuvant.  
512 *Vaccine*, 31(1), 31–9. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.095
- 513 Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in  
514 chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15. doi:10.1051/apido:2000102
- 515 Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J. G., & Ote, I. (2014). Associations between  
516 properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from  
517 bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), 74–9. doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.010
- 518 Camussone, C. M., Veaute, C. M., Pujato, N., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvino, L. F.  
519 (2014). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and  
520 lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Research in Veterinary Science*,  
521 96(1), 86–94. doi:10.1016/j.rvsc.2013.10.004
- 522 Cascioferro, S., Totsika, M., & Schillaci, D. (2014). Sortase A: an ideal target for anti-  
523 virulence drug development. *Microbial Pathogenesis*, 77, 105–12.  
524 doi:10.1016/j.micpath.2014.10.007

- 525 Chinchali, J. F., & Kaliwal, B. B. (2014). Histopathology of mammary gland in  
526 *Staphylococcus aureus* induced mastitis in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical*  
527 *Disease*, 4, S320–S325. doi:10.1016/S2222-1808(14)60463-1
- 528 Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V., & Britten,  
529 M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step  
530 sequential extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 609–614.  
531 doi:10.1016/j.lwt.2014.08.045
- 532 De Vliegher, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012). Invited  
533 review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and  
534 control. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1025–40. doi:10.3168/jds.2010-4074
- 535 Fischer, G., Cleff, M. B., Dummer, L. A., Paulino, N., Paulino, A. S., de Oliveira Vilela, C.,  
536 ... Vidor, T. (2007). Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of  
537 bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and*  
538 *Immunopathology*, 116(1-2), 79–84. doi:10.1016/j.vetimm.2007.01.003
- 539 Fischer, G., Conceição, F. R., Leite, F. P. L., Dummer, L. A., Vargas, G. D., Hübner, S. de  
540 O., ... Vidor, T. (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on  
541 humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25(7), 1250–6.  
542 doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.005
- 543 Fonseca, I., Silva, P. V., Lange, C. C., Guimarães, M. F. M., Weller, M. M. D. C. A., Sousa,  
544 K. R. S., ... Guimarães, S. E. F. (2009). Expression profile of genes associated with  
545 mastitis in dairy cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 32(4), 776–81.  
546 doi:10.1590/S1415-47572009005000074
- 547 Gonçalves, J. L., Tomazi, T., Barreiro, J. R., Braga, P. A. de C., Ferreira, C. R., Araújo  
548 Junior, J. P., ... dos Santos, M. V. (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated

- 549 from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of  
550 flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 173(1-2), 147–51.  
551 doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.028
- 552 Helmbj, H., & Grecis, R. K. (2004). Interleukin 1 plays a major role in the development of  
553 Th2-mediated immunity. *European Journal of Immunology*, 34(12), 3674–81.  
554 doi:10.1002/eji.200425452
- 555 Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: new  
556 developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16–23.  
557 doi:10.1080/00480169.2011.547165
- 558 Hortet, P., & Seegers, H. (1998). Loss in milk yield and related composition changes  
559 resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1-4), 1–  
560 20. doi:10.1016/S0167-5877(98)00104-4
- 561 Hosseinzadeh, S., & Dastmalchi Saei, H. (2014). Staphylococcal species associated with  
562 bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci.  
563 *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 27–34.  
564 doi:10.1016/j.ijvsm.2014.02.001
- 565 Lima, K. M., dos Santos, S. A., Rodrigues, J. M., & Silva, C. L. (2004). Vaccine adjuvant: it  
566 makes the difference. *Vaccine*, 22(19), 2374–9. doi:10.1016/j.vaccine.2003.12.030
- 567 Ma, X., Guo, Z., Shen, Z., Wang, J., Hu, Y., & Wang, D. (2011). The immune  
568 enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig.  
569 *Cellular Immunology*, 270(1), 13–8. doi:10.1016/j.cellimm.2011.03.020
- 570 Moser, B., Schaerli, P., & Loetscher, P. (2002). CXCR5+ T cells: follicular homing takes  
571 center stage in T-helper-cell responses. *Trends in Immunology*, 23(5), 250–254.  
572 doi:10.1016/S1471-4906(02)02218-4

- 573 Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Odierno, L., & Bogni, C. (2010). Efficacy of  
574 immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant  
575 vaccine. *Vaccine*, 28(28), 4523–8. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.056
- 576 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
577 PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. Retrieved from  
578 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendert](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)  
579 [ype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
- 580 PINTO, M. S., FARIA, J. E. de, MESSAGE, D., CASSINI, S. T. A., PEREIRA, C. S., &  
581 GIOSO, M. M. (2001). Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas  
582 isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*  
583 *Animal Science*, 38(6), 278–283. doi:10.1590/S1413-95962001000600006
- 584 Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., & Costa, L. (2010). Study of the humoral  
585 immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded  
586 bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production  
587 in the protection from *Staphylococcus aureus* induced ma. *Veterinary Immunology and*  
588 *Immunopathology*, 134(3-4), 208–17. doi:10.1016/j.vetimm.2009.09.020
- 589 Salgado-Pabón, W., & Schlievert, P. M. (2014). Models matter: the search for an effective  
590 *Staphylococcus aureus* vaccine. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(8), 585–591.  
591 doi:10.1038/nrmicro3308
- 592 Seegers, H., Fourichon, C., & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis  
593 and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 34(5), 475–91.  
594 doi:10.1051/vetres:2003027
- 595 Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of*  
596 *Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. doi:10.1016/j.jep.2007.05.012

- 597 Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of  
598 new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253–60. doi:10.1016/j.jep.2010.10.032
- 599 Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M., & Milewski, S.  
600 (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*.  
601 *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1157–74. doi:10.1007/s00253-012-4484-3
- 602 Wang, D., Wang, Z., Yan, Z., Wu, J., Ali, T., Li, J., ... Han, B. (2015). Bovine mastitis  
603 *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular  
604 typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics  
605 and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious  
606 Diseases*, 31C, 9–16. doi:10.1016/j.meegid.2014.12.039
- 607 Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine  
608 mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*,  
609 192(2), 148–52. doi:10.1016/j.tvjl.2011.09.013
- 610 Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., & Piccinini, R. (2006). Role of several  
611 *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine  
612 mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, 40(4), 177–83.  
613 doi:10.1016/j.micpath.2006.01.001

## Ilustrações e figuras

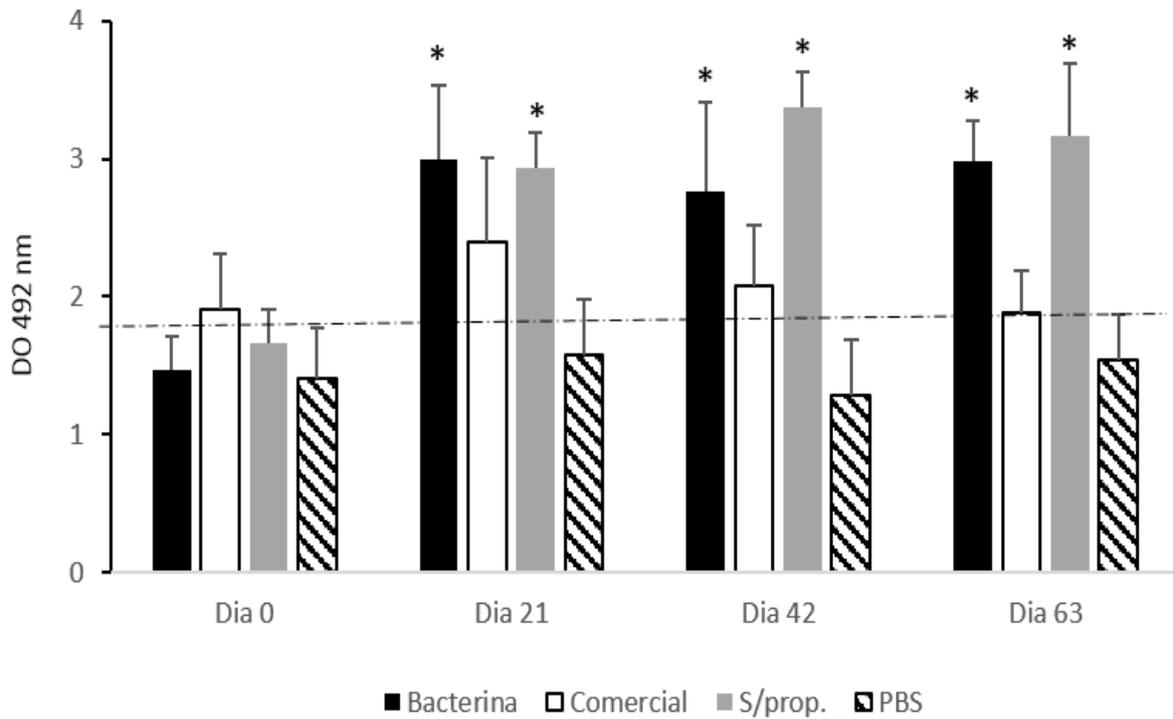


FIGURA 1. Níveis de IgG total em soro de bovinos inoculados com diferentes formulações de bacterina para controle de mastite e PBS nos dias 0, 21, 42 e 63. Os dados representam os valores de densidade óptica (DO), Os resultados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística realizada foi LSD para verificar as diferenças estatísticas. \* $p < 0,001$ .

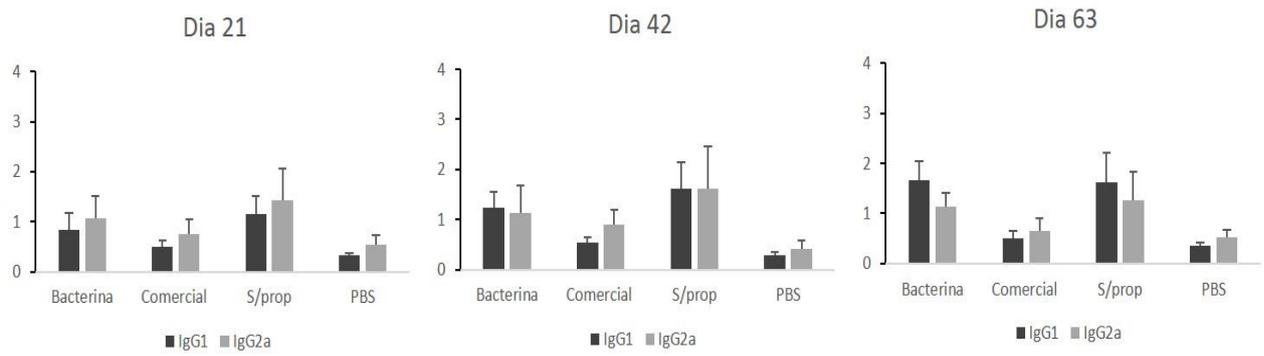


Figura 2. Isotipagem de IgG em soro bovino. Níveis de IgG1 (barra preta) e IgG2a (barra cinza) de amostras coletadas nos dias 21, 42 e 63. Os dados representam a média  $\pm$  desvios padrões obtidos de amostras testadas em triplicata.

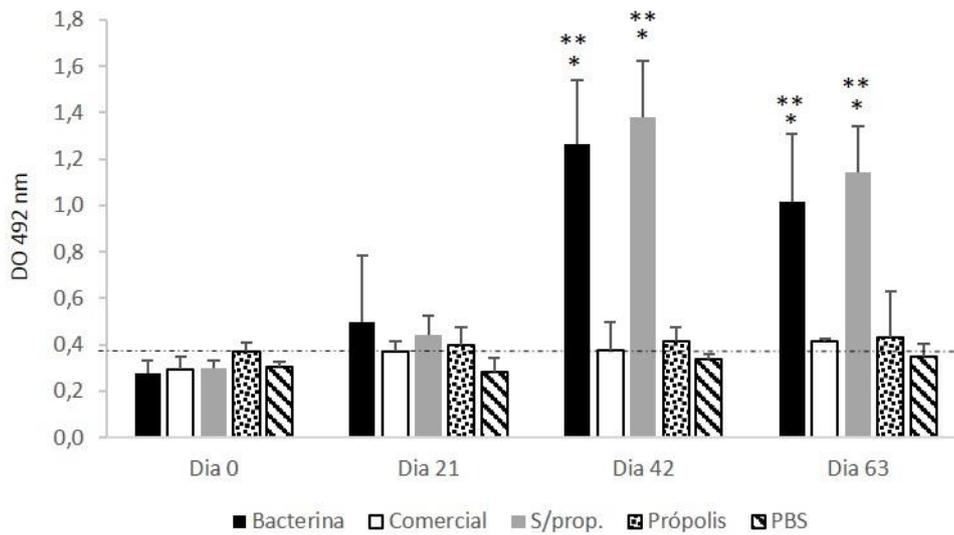


FIGURA 3. Níveis de IgG total em soro de camundongo BALB/c inoculados com diferentes formulações de bacterina para controle de mastite e PBS nos dias 0, 21, 42 e 63. Os dados representam os valores de densidade óptica (DO). Os resultados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística realizada foi LSD para verificar as diferenças estatísticas. \* $p < 0,05$ , para os mesmos tratamentos nos dias 42 e 63 em relação a todos os demais tratamentos. \*\*  $p < 0,01$  para os tratamentos (bacterina e sem própolis) sem haver diferença entre os dias de coleta (42 e 63).

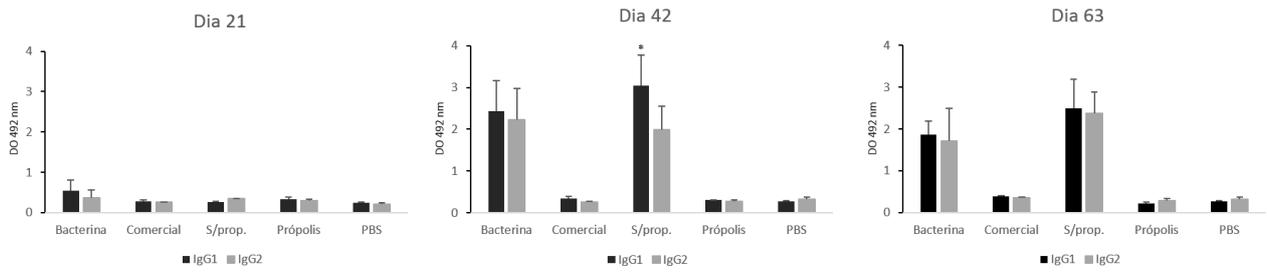


Figura 4. Isotipagem de imunoglobulinas em soro de camundongos BALB/c. Níveis de IgG1 (barra preta) e IgG2a (barra cinza) de amostras coletadas nos dias 21, 42 e 63. Os dados representam a média  $\pm$  desvios padrões obtidos de amostras testadas em triplicata. \* $p < 0,05$ .

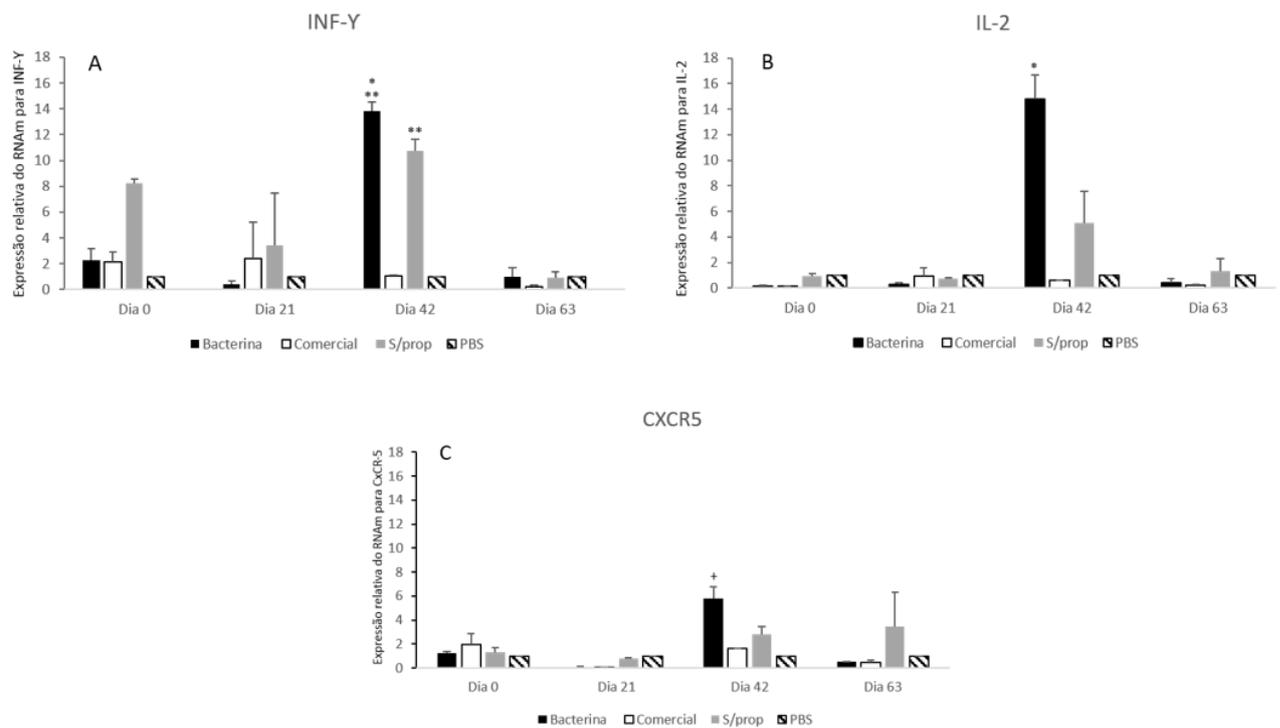


FIGURA 5. Expressão relativa de RNA de citocinas por leucócitos em bovinos. As células foram estimuladas *in vitro* com *S. aureus* inativado ( $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>) por 18 horas. O RNA total foi extraído e o cDNA correspondente foi submetido a qPCR. As expressões de INF- $\gamma$  (A), IL-2 (B) e CXCR-5 (C) foram calculadas a partir de valores do ciclo de *threshold* (Ct), normalizados por valores de Ct obtidos a partir de leucócitos de bovinos não vacinados. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística realizada foi LSD para verificar as diferenças estatísticas obtidas pelas medidas de repetição. \* $p < 0,001$  do tratamento em relação a todos os outros tratamentos e dia da citocina pesquisada. \*\* $p < 0,001$  para esse tratamento em relação a outros tratamentos do mesmo dia. +  $p < 0,01$  do tratamento em relação a todos os outros tratamentos e dias para citocina pesquisada.

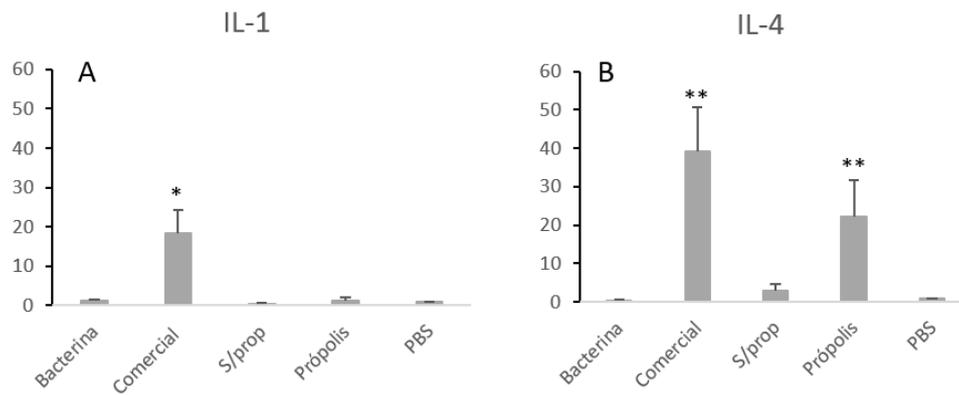


FIGURA 6. Expressão relativa de RNA de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c. As células foram estimuladas *in vitro* com *S. aureus* inativado ( $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>) por 18 horas. O RNA total foi extraído e o cDNA correspondente foi submetido a qPCR. A expressão de IL-1 (A) e IL-4 (B) foram calculadas a partir de valores do ciclo de *threshold* (Ct), normalizados por valores de Ct obtidos a partir de esplenócitos de camundongos não vacinados. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística realizada foi LSD para verificar as diferenças estatísticas obtidas pelas medidas de repetição. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## Tabelas e legendas

Tabela 1. Sequência de iniciadores qPCR para citocinas em cultivo de leucócitos bovinos

Gene	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (3'-5')</i>	TM(°C)
$\beta$ -actina	TGTCCACCTTCCAGCAGATG	CTAGAAGCATTGCGGTGGA	57,1
INF- $\gamma$	CAGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGA	CAGGCAGGAGGACCATTACG	60,0
IL-2	CCTCGAGTCCTGCCACAATG	CCGTAGAGCTTGAAGTAGGTGC	57,3
CXCR5	TACCCTCTCACTCTGGACATGG	CTCCGTA CTGTCATTGTAGCTCC	57,7

Tabela 2. Sequência de iniciadores qPCR para citocinas em cultivo de esplenócitos de camundongos BALB/c

Gene	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (3'-5')</i>	TM(°C)
$\beta$ -actina	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	59,6
IL-1	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	58,8
IL-4	CCAAGGTGCTTCGCATATTT	ATCGAAAAGCCCGAAAGAGTACA	60,0

## 5 Considerações finais

- A análise cromatográfica da amostra do extrato hidroalcoólico de própolis verde utilizada na pesquisa indicou a presença de ácido fenólico, ácido paracumárico e artepelin C.

- Foi observado que, 21 dias após a primeira dose de bacterina contendo própolis como adjuvante, em bovinos houve aumento de IgG, permanecendo altos até o dia 63, que correspondeu ao final do experimento.

- O aumento de IgG em bovinos vacinados com a bacterina contendo própolis como adjuvante, foi observado também nos animais aos quais foi utilizado a bacterina sem própolis.

- Na atual pesquisa e com a metodologia utilizada, observou-se que a IgG, nos bovinos que foram tratados com a vacina comercialmente disponível, foi menor do que o observado para a bacterina contendo própolis como adjuvante e bacterina sem própolis.

- Em camundongos, os níveis de IgG aumentaram progressivamente até o 42º dia após a primeira dose de bacterina contendo própolis verde como adjuvante e vacina sem própolis, com declínio no dia 63.

- Tanto em bovinos como em camundongos foi observada uma tendência de imunomodulação para os animais que receberam a bacterina contendo própolis verde como adjuvante e a vacina sem própolis.

- Nos bovinos, foi observado no 42 dia, que houve expressão 13,7 superior de transcrição de RNAm para INF- $\gamma$ , 14,7 vezes mais transcrição de RNAm para IL-2 e 5,7 vezes mais transcrição de RNAm para CXCR-5 nos animais que foram vacinados com a bacterina contendo própolis verde como adjuvante, em relação aos animais do grupo controle negativo.

- O própolis verde, na forma de extrato hidroalcoólico, tem potencial para atuar como adjuvante em uma vacina para mastite bovina por *S. aureus*, através de sua ação imunomoduladora.

## Referências

ALBERTON, L. R. et al. Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia** [da] Universidade do Paraná. v.4, n.1, p.31-40, jan-jun 2001.

ALMEIDA, A. et al. Detection and discrimination of common bovine mastitis-causing streptococci. **Veterinary microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 370–7, 28 jun. 2013.

ANAYA-LÓPEZ, J. L., et al. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**. n.81, n.3, p.358-361, Dez 2006.

ARAÚJO, W. P. *Staphylococcus aureus* em leite cru. Caracterização da origem provável, humana ou bovina, das cepas isoladas. **Hora Veterinária**. Ano.9, n.49. 1989.

ASHRY, E. S. H. EL; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 31–9, 17 dez. 2012.

BAGNOLI, F. et al. Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. n.2, Fev 2012

BANKOVA, V. S., et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2000.

BELLOTI, V. **Mastite subclínica bovina: ocorrência, caracterização bioquímica e perfil plasmidial dos *Staphylococcus coagulase negativos***. 1992. 95f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências, Universidade de São Paulo. 1992.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 8th. ed. Gaithersburg: FDA, 1995. p. 12.01-12.05.

BIDDLE, M. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycoplasma* isolates from various body sites in dairy cattle with *Mycoplasma mastitis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 3, p. 455–459, 20 ago. 2005.

BRADLEY, A. J. et al. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. **Journal of dairy science**, 18 dez. 2014.

CAMUSSONE, C. et al. Respuesta Inmune Humoral contra una Bacterina de *Staphylococcus Aureus* CP5 en Vaquillonas Empleando Dos Vías de Inoculación. **Revista FAVE - Ciencias Veterinarias**. v.9, n.2, 2010.

CAPURRO, A., et al. Identification of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.40, p.315-321. 1999

CHAVHAN, S. K., et al. Molecular characterization of intercellular adhesion gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk. **Tropical Animal Health and Production**. v.44, n.2, p.247-252, fev 2012.

COELHO, S. M., et al. Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**. v. 94, n.7, p.3305-3310, jul 2011.

COSTA, E. O.; et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.17, n.5, p.215-217, 1995.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DETILLEUX, J.; et al. Mediation analysis to estimate direct and indirect milk losses due to clinical mastitis in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, jan. 2015.

DUTTA, G.N.; et al. Economic implications of treatment of lactating cows for subclinical mastitis. **Indian Veterinary Journal**. v.72, p.420-422.1995.

EUZÉBY, J. P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/hyicus.html>> Acesso em 26 jan 2015.

FERREIRA, L. M., et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**. v.36, n.4, p.1228-1234, ago 2006.

FISCHER, G., et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**. v.25, n.7, p.1250-1256, jan 2007.

FISCHER, G., et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr-jun 2008.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250–6, 26 jan. 2007a.

FISCHER, G. et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 79–84, 15 mar. 2007b.

FISCHER, G., et al. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.105, n.7, p.908-913, nov 2010.

GIANNECHINI, R., et al. Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.43, p.221-230, 2002.

GONÇALVES, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 147–51, 17 set. 2014.

GUIDRY, A. J., et al. Effect of Whole *Staphylococcus aureus* and Mode of Immunization on Bovine Opsonizing Antibodies to Capsule. **Journal of Dairy Science**. v.77, n.10, p.2965-2974, Out 1994.

HARVEY, J. GILMOUR, A. Applications of current methods for isolation and identification of *Staphylococci* in raw bovine milk. **Journal of Applied Microbiology**. v.59, p.207-221, 1985.

HASHEMI, M., et al The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz University, v.12, n.3, p. 236-241, 2011,

HASSLER, C.; et al. Characteristics of Staphylococcus hyicus strains isolated from pig carcasses in two different slaughterhouses. **Meat Science**. v.80, n.2, p. 505-510, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174008000326>>. Acessado em 22 ago 2011.

HILL, B. M. The thermo-stable nuclease test as a method for identifying Staphylococcus aureus. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v.38, n.3, p.95-96, 1983.

HORA, V. P., et al. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, n.8, p.1538-1544, fev 2011.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-4, p. 1–20, dez. 1998.

HOSSEINZADEH, S.; DASTMALCHI SAEI, H. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27–34, jun. 2014.

HU, S., et al. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against Staphylococcus aureus in dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.91, n.1, p.29-37, jan 2003.

HUTCHINSON, L. E., et al. Cloning bovine cytokine cDNA fragments and measuring bovine cytokine mRNA using the reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 44, p. 13-29, 1994.

JABLONSKY, L.M.; BOHACH, G.A. Staphylococcus aureus. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed). **Food Microbiology.: Fundamentals and Frontier**. Washington: ASM Press, 1997, p.353-376.

JAY, J.M. Staphylococcal Gastroenteritis. In: \_\_\_\_\_. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen Publishers, 2000. p.441-459.

KAUF, A. C., et al. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **Research in Veterinary Science**. v.82, n.1. p.39-46, fev 2007.

KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. V. Pathogen's Swiss Army Knife. (2009). Disponível em <<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/03/a-pathogens-swiss-army-knife.html>>. Acessado em 29 jan. 2015.

LADEIRA S.R.L. Mastite bovina. In: Riet-Correa F; Schild A.L.; Lemos R.A.A.; Borges J.R.J. (Ed). **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. 3ª ed. Santa Maria: Editora Pallotti, 2007. p.359-370.

LANGLOIS, B. E.; et al.. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. **Journal of Food Protection**. v.53, n.2, p.119-126, 1990.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. F.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.11, p.881-886, 2009.

LANGENEGGER, H., et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p.437-440, 1970.

LARANJA, L.F., et al. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Scientia Agricola**. v.51, n.3, p.578-585, set-dez 1994.

LEITNER, G., et al. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. **Research in Veterinary Science**. v.69, n.2, p.181-184, out 2000.

LEITNER, G., et al. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.35, p.99-106, 2003.

LEITNER, G., et al. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.142, n.1-2, p.25–35, jul 2011.

LIMA, K. M. et al. Vaccine adjuvant: it makes the difference. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2374–9, 23 jun. 2004.

LOCATELLI, C. et al. Effect on quarter milk somatic cell count and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus rostri* causing intramammary infection in dairy water buffaloes. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 6, p. 3799–805, 6 jun. 2013.

LOGUERCIO, A. P., et al. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.2, p.347-349, fev 2006.

LOTTI, C. et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209–13, 24 fev. 2010.

LUSTOSA, S. R., et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MA, X., ., et al. The immune enhancement of propolis aduvant on inactivated porcine. **Cellular Immunology**. v.270, n.1, p.13-18, 2011.

MA, J., et al. Evaluation of Serotypes of *Staphylococcus aureus* Strains Used in the Production of a Bovine Mastitis Bacterin. **journal of Dairy Science**. v.1, n.87, p.178-182, 2004.

MARCUCCI, M.C., et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.105-112, 2001.

McDOUGALL, S., et al. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Veterinary Microbiology**. v.134, n.1-2, p177-185, fev 2009.

MCDOWELL, G. H.; WATSON, D. L. Immunity to experimental staphylococcal mastitis: comparison of local and systemic immunization. **Australian Veterinary Journal**. v.50, n.1-2, p.533-536, dez 1974.

MELLENBERGER, R. W. Vaccination Against Mastitis. **Journal of Dairy Science**. v.60, n.6, p.1016-1021, jun 1977.

MENDONÇA, C. L., et al. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MIDDLETON, J.R., et al. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. **Veterinary Microbiology**. v.16, n.134(1-2), p.192-198, Fev 2009.

MEEUSEN, E. N. T. et al. Current status of veterinary vaccines. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 489–510, table of contents, jul. 2007.

NADER FILHO, A.; et al. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo “B”. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. n.35, v.5, p.621-629, 1983.

NAKASHIMA, K.-I. et al. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 10, p. 3034–41, out. 2014.

OLIVEIRA, A. A.; et al. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia. v.10, n.1, p.226-230, 2009. Disponível em <[www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/1780/4589](http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/1780/4589)> . Acesso em: 13 jul 2011.

OLIVEIRA, C. M. C., et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, fev 2011.

OPDEBEECK, J.P., et al. Antibodies in bovine serum and lactal secretions to capsular antigens of Staphylococcal aureus. **American Journal Veterinary Research**, v.46, n.7, p.1561, 1985.

PAULINO, N. et al. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.** n.54, v.6, p. 845-852, jun 2002.

PELEGRINO, M. et al. Experimental trial in heifers vaccinated with Staphylococcus aureus avirulent mutant against bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. v.127, p. 186-190, 2008.

PELEGRINO, M, et al. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a Staphylococcus aureus avirulent mutant vaccine. **Vaccine**. v.17, n.28, p. 4523-4528, Jun 2010.

PEREIRA, U. P., et al. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. **Veterinary Microbiology**. n.148, v.2-4, p.117-124, nov 2010.

PHILLIPS, E.; NASH, P. Culture media. In: LENETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOMY, H.J. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p.1051-1092.

PHILPOT, N., NICKERSON, S. C. Formas e Prevalência da Mastite. In \_\_\_\_\_ . **Vencendo a Luta Contra a Mastite**. São Paulo: Ed. Milkbizz, 2002. p.10-13.

PINTO, L. M. A., et al. Propriedades, usos e aplicações da própolis. v.3, n.76, 2011. Disponível em <<http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/download/15805/9701>> Consultado em 9 jan 2015.

PORTES, V. M., et al. Efeito da vacinação contra a Mastite Estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* sp. a células do leite. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, n.2, p.137-141, 2006.

PRENAFETA, A., et al. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.134, p.208-217, 2010.

PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Association between an outbreak strain causing mycoplasma bovis mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 1, p. 66–70, 1 jan. 2010.

PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. **Preventive veterinary medicine**, v. 98, n. 1, p. 74–8, 1 jan. 2011.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONENA, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**. v. 134, n.1-2, p.3-8, 2009. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800357X>>. Acesso em: 4 abr. 2011.

QUINN, P. J. et al. Gênero *Staphylococcus*. In \_\_\_\_\_ . **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2007. p.55-60.

RADAELLI, E. et al. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 2, p. 251–3, out. 2011.

RADOSTITS, O. M.; et al. . **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2002. 604p.

RADTKE, A. et al. Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 157, n. 3-4, p. 398–404, 15 jun. 2012.

REBHUN, W. C. Doenças das Tetas e do Úbere. In \_\_\_\_\_ . **Doenças do Gado Leiteiro**. São Paulo: Ed. ROCA, 2000. p.309-378.

RIBEIRO, M. E. R., et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não-infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, n.3, p.287-290, jul-set, 2003.

Ribeiro, M. G., et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.1, p.52-58, 2009.

RICH, K. M.; PERRY, B. D. The economic and poverty impacts of animal diseases in developing countries: new roles, new demands for economics and epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 101, n.3-4, p.133-147, set 2011.

ROSSETTI, B. C., et al. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 24, n. 5, p. 321–3, out. 2010.

SANTOS, L. L., et al. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia. v.11, n.4, p.860-866, 2010.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto – enfermagem**. v.13, p. 64-70, 2004.

SCAZZOCCHIO, F., et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**. v.161, n.4, p.327-333, 2006.

SCHALM, G.N.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **The Journal of American Medical Association**. v.130, p.199–204, 1957.

SCHIEIFER, K. H.; BELL, J. A. Family VIII. Staphylococcaceae family. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. v.3, 2009, p. 392.

SCHLEGELOVÁ, J., et al. Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on farms differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**. v.92, p.327-334, 2003.

SCHOKEN-ITURRINO, R. P., et al. Pesquisa de S. aureus Enterotoxigênicos em amostras de leite de vacas mamáticas. **Ars Veterinária**. v.2, n.1, p.69-74, 1986.

SCHUCH, L. F. D., et al. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 161-169, jan.-mar 2008.

SCHUKKEN, Y. H. et al. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 9–14, 16 fev. 2009.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.15, n.144, p.270-289, dez 2011.

SEARS, P.M., McCARTHY, K. K. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. v..19, n.1, p.93-108, mar 2003.

SFORCIN, J. M; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p. 253–260, 2011.

SILVA, N., et al. Staphylococcus aureus. In: \_\_\_\_\_. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. p.137-148.

SILVA, W.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de Staphylococcus aureus isolados de leite de vacas com mamite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. 1998. 98p. Tese (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia dos alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159p

SNEL, G. G. M. et al. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 3-4, p. 489–95, 5 dez. 2014.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **J Mammary Gland. Biol. Neoplasia**. v.7, n.2, p.135-146. Abr 2002.

SOUTO, L. I., et al. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **Journal of Dairy Research**. v.77, p.63-70. 2010.

SPANAMBERG, A., et al.. Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.25, p.154-156, 2008.

STRUELENS, M.J., et al. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal Clinical Microbiology**. v.30, p.2599-2605, 1992.

STIPKOVITS, L. et al. Short communication: role of *Mycoplasma arginini* in mastitis caused by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 3, p. 1661–7, 3 mar. 2013.

SUPRÉ, K. et al. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2329–40, 5 maio 2011.

TALBOT, B.G., LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock Production Science**. v.98, n.1-2, p.101-113, Dez 2005.

TANG, Y. W.; STRATTON, C. W. *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. **Clinics in Laboratory Medicine**. v.30, n.1, p.179-208, 2010.

TARGOWSKI, S.P. Role of immune factors in protection of mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.66, n.8, p.1781-1789, 1983.

VARALDO, P. E., et al. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.38, n.4, p.436–439, 1988.

VASIL, M. Etiology, course and reduction of incidence of environmental mastitis in the herd of dairy cows. **Slovak Journal Animal Science**. v.42, n.3, p. 136-144, 2009.

VIÇOSA, G. M., et al. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**. v.27, n.4, p. 447-452, 2010.

WATSON, D. L. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. **Research in Veterinary Science**. v.53, n.3, p.346-353, nov 1992.

WATSON, D. L., et al. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. **Australian Veterinary Journal**. v.74, n.6, p.447-450, dez 1996.

YAZDANKHAN, S.P.; OLSEN, E. Simple and direct detection of *Staphylococcus aureus* in milk by a tube coagulase test. **Letters in Applied Microbiology**. v.27. p.111-115, 1998.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.22, p. 229–261, 2006.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in invasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**. v.150, p.12-22, 2013.