



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO
EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

TAISA GROTTI PEREIRA

**EFEITO PROTETOR DA VACINA AUTÓGENA CONTRA OS
ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA**

Arapongas
2015

TAISA GROTTI PEREIRA

**EFEITO PROTETOR DA VACINA AUTÓGENA CONTRA OS
ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Elsa H. W. de Santana.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz César da Silva.

TAISA GROTTI PEREIRA

**EFEITO PROTETOR DA VACINA AUTÓGENA CONTRA OS
ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ISOLADOS DE MASTITE
BOVINA SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina [UEL] e Universidade Norte do Paraná [UNOPAR]), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Orientadora Elsa Helena W.
Santana
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha
Filho
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Joice Sifuentes dos Santos
Universidade Norte do Paraná

Arapongas, 13 de março de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, pois tudo o que eu sou, o que quero ser, o que planejo ser, pertencem a Ti, só a Ti Deus.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos recebidas me possibilitando de junto a Ele chegar até aqui.

Aos meus familiares por todo apoio recebido me impulsionando a cumprir mais uma etapa tão importante em minha vida.

Ao meu marido e filho pela paciência, amor e dedicação.

Agradeço a minha orientadora dra. Elsa Helena não só pela orientação neste trabalho, mas sobretudo pela disponibilidade e atenção.

Ao professor e co-orientador Luiz César pela confiança e pela experiência profissional transmitida.

Ao professor Werner Okano pela total dedicação e orientação a todos os alunos do Mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes da Unopar.

Ao colega de iniciação científica André, pela contribuição nas realizações dos experimentos.

A todos os professores, alunos e funcionários da UNOPAR pela ajuda e motivação e por terem sido essenciais nesta caminhada, em especial a Kelly do laboratório de microbiologia veterinária/UNOPAR ao professor Alexey e a Roberta do laboratório de Biologia Molecular/UNOPAR.

À Universidade Norte do Paraná – UNOPAR e a Universidade Estadual de Londrina – UEL, pela oportunidade de aprendizado pessoal, profissional e acadêmico.

A todos os amigos e companheiros que me acompanharam nessa jornada, o meu muito obrigado.

**“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13**

PEREIRA, Taisa Grotti. **Efeito Protetor da Vacina Autóloga Contra os Estafilococos Coagulase Positivos Isolados de Casos de Mastite Bovina Subclínica**. 2015.38 f. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

RESUMO

A mastite bovina é a doença que mais acomete bovinos leiteiros. Caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária frente a diversas agressões, sendo que 90% são causadas por bactérias. O controle dessa doença através da vacina resulta numa proteção modesta, o que tem inibido a utilização de vacinas pelos criadores. Resultados positivos e negativos são encontrados quanto ao uso de vacinas para mastite. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito protetor da vacina autógena contra os estafilococos coagulase positiva isolados de bovinos com mastite subclínica. Foram analisados 72 quartos mamários através do CMT para diagnóstico da mastite subclínica. As amostras positivas para a presença de estafilococcus, foram submetidas ao teste bioquímico da coagulase e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a confirmação dos Estafilococos Coagulase Positivos (ECP). A *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP) foi realizada para identificação dos padrões polimórficos presentes no gene da coagulase. A vacina foi produzida com os agentes ECP, e os animais foram vacinados com 2 doses de 5ml via subcutânea com 30 dias de intervalo. Após 90 dias da vacinação, todos os testes foram refeitos para avaliar alterações no polimorfismo genético. Concluindo-se que a vacina teve efeito profilático, pois não houve a incidência de novos micro-organismos confirmados pelo polimorfismo, e curativo pois duas espécies de ECP foram erradicadas.

Palavras-chave: PCR. RFLP. *Staphylococcus* spp.. Polimorfismo.

PEREIRA, Taisa Grotti. **Effect Vaccine Shield Autogenic About Coagulase Positive Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis Subclinical Cases.**2015. 38 f. Master in Health and Ruminant Production (Academic Master Health and Ruminant Production) – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, 2015.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease that affects more dairy cattle. It is characterized by inflammation of the mammary gland forward to several assaults, and 90% are caused by bacteria. Control of this disease from the vaccine results in a modest protection, which has inhibited the use of vaccines by the creators. Positive and negative results are found in the use of vaccines for mastitis. The objective was to evaluate the protective effect of autogenous vaccine against coagulase positive staphylococci isolated from cattle with subclinical mastitis. We analyzed 72 breast room through the CMT for diagnosis of subclinical mastitis. The samples positive for the presence of staphylococcal were subjected to biochemical and coagulase test the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), for confirmation of *Staphylococcus* Coagulase Positive (ECP). The Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was performed to identify the polymorphic patterns present in the coagulase gene. The vaccine was produced with ECP agents, and the animals were vaccinated with two doses of 5 ml subcutaneously with 30-day interval. After 90 days of vaccination, all the tests were redone to evaluate changes in the genetic polymorphism. In conclusion that the vaccine has prophylactic effect, as there was no incidence of new polymorphism confirmed by microorganisms, and curative for two species of ECP were eradicated.

Key words: PCR. RFLP. *Staphylococcus* spp.. Polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Monografia

Figura 1 – Fluxograma da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)21

Artigo

Figura 1 – Perfis eletroforéticos representativos dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP) do gene *coa* de *Estafilococos Coagulase Positiva* (ECP)33

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Presença de *Staphylococcus* spp. e a capacidade de produção da enzima coagulase (teste bioquímico e PCR) em leites provenientes de vacas com mastite subclínica antes (AV) e após (PV) o uso de vacina autógena32

Tabela 2 – Agentes etiológicos e o perfil da *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP) do gene coagulase positiva isolados do leite de vacas com mastite sub-clínica antes da vacinação e 90 dias após a vacinação.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS	Contagem de Células Somáticas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
ECP	Estafilococos Coagulase Positiva
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CMT	<i>Califórnia Mastitis Test</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DDA	Cloreto de Dimetildioctadecilamônio
pb	Pares de Base

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA - CONTEXTUALIZAÇÃO	14
2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO ESTADO DO PARANÁ	14
2.2 MASTITE	15
2.2.1 Diagnóstico da Mastite	16
2.2.2 Prevenção da Mastite.....	17
2.3 <i>STHAPYLOCOCCUS</i> SPP	18
2.3.1 Estafilococos Coagulase Positiva (ECP)	19
2.3.2 Identificação dos ECP	20
2.3.2.1 Biologia Molecular da Diferenciação dos Estafilococos.....	20
2.4 VACINAS	22
2.4.1 Vacinas Comerciais.....	22
2.4.2 Vacinas Autógenas	23
3 ARTIGO	24
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os produtores leiteiros, para atingirem os seus objetivos, precisam da redução da Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite produzido no Brasil, cumprindo a Instrução Normativa 62/2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visa reduzir os níveis de tolerância de 600.000 células/ml para 400.000 cél/ml gradativamente até julho de 2016 (1). Portanto esforços para identificar agentes e métodos que auxiliem no seu controle são importantes nesse processo.

A inflamação da glândula mamária ou mastite é considerada uma das doenças mais comuns em gado leiteiro. Esta se caracteriza por um processo inflamatório, geralmente de caráter infeccioso, causado pelos mais diversos agentes. A mastite pode ser classificada como mastite clínica ou subclínica. A mastite clínica resulta em mudanças no aspecto da secreção láctea, mudanças visíveis no tecido mamário e alguns efeitos sistêmicos. A mastite subclínica não apresenta alterações macroscópicas detectáveis, porém apresenta alterações microbiológicas e químicas do leite. Esta forma é normalmente a mais prevalente, responsável por aproximadamente 70% das perdas (2;3).

As principais causas de infecções intramamárias são as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., sendo que *S. aureus* é a espécie que mais acomete casos de mastite subclínica, além de ser a responsável pelas maiores perdas econômicas das explorações leiteiras em todos os continentes (4). Dentre o grupo de estafilococos coagulase positiva (ECP), a espécie *S. aureus* também foi a principal espécie identificada por Santos et al (5).

A produção da enzima coagulase pode ser considerada uma característica de *S. aureus* potencialmente patogênica (6), sendo as enzimas coagulase responsáveis pela coagulação sanguínea. Através da atividade desta enzima pode se distinguir espécies patogênicas ou não de *Staphylococcus* spp. (7). Alguns estudos vêm aplicando análises moleculares do gene da coagulase para subdividir os *S. aureus*, baseando-se no seu

polimorfismo genético, por ser um teste preciso (8). O polimorfismo genético é a variação na sequência de bases do DNA com frequência maior do que 1% da população de uma espécie. Pode gerar variabilidade genética sendo transmitidas de geração em geração (9).

A identificação e caracterização das infecções intramamárias são fundamentais tanto para um diagnóstico mais preciso, como para a produção de vacinas mais eficazes. A produção da vacina autógena com o agente que está infectando o rebanho poderá induzir uma imunidade mais eficiente e duradoura, que irá refletir no controle da doença e na produtividade do animal (10).

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da vacina autógena contra estafilococos coagulase positiva isolados de bovinos leiteiros com mastite subclínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO ESTADO DO PARANÁ

A produção nacional de leite e derivados cresceu 5% em 2014, conforme projetado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), chegando a 36,75 bilhões de litros no ano, sendo que em 2013 a produção foi de 35 bilhões de litros (11). Esses valores mostram que o Brasil caminha para ocupar o 3º lugar no ranking dos maiores produtores de leite do mundo, sendo que o setor cresceu 14,2% entre janeiro e maio em relação ao mesmo período em 2013 (12).

A região brasileira com maior produção leiteira há décadas é a Sudeste, seguidas pelas regiões Sul e Centro-Oeste. Já os Estados com maior produção são Minas Gerais (27,4%), Rio Grande do Sul (13,5%), Paraná (11,6%) e Goiás (10,9%) (13).

Conforme os dados de leite inspecionado, em 2013 o Estado do Paraná teve aumento na produção leiteira de 8,8%, fechando o ano com total de produção sob inspeção de 2.818.337 mil litros (14). E para 2014 a expectativa é que o Paraná continue a aumentar a produção e que em breve seja o segundo maior produtor de leite do País. Já no Brasil o aumento na produção de leite no segundo trimestre de 2014 foi de 8,4%, referente ao mesmo período do ano anterior, conforme projeção do IBGE (15).

Apesar dos dados indicarem aumento na produção de leite no Brasil, duas características são marcantes na pecuária leiteira. Uma delas é que a produção ocorre em todo o território nacional, e a outra é que, apesar disso, não existe uma padronização na produção. Há um grande número de estabelecimentos que desenvolvem a atividade leiteira, porém em condições ainda precárias, enquanto alguns são comparáveis aos mais competitivos do mundo, usando tecnologias avançadas e com produção diária superior a 60 mil litros (16).

No Estado do Paraná, a bovinocultura leiteira emprega milhares de famílias no meio rural. No entanto, como em muitas outras regiões do país, apresenta problemas relacionados à sazonalidade forrageira, ao balanceamento da dieta alimentar, ao melhoramento genético, à sanidade do rebanho, à qualidade do leite, à assistência técnica, à industrialização e à comercialização dos produtos (17).

2.2 MASTITE

A qualidade e quantidade do leite é bastante reduzida em sua produção e industrialização devido à mastite. A mastite é um processo inflamatório e infeccioso da glândula mamária, classificada como clínica ou subclínica, dependendo das alterações causadas (18;19).

Sob a forma clínica há sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, produção de grumos, pus, sangue ou qualquer alteração das características do leite. Já a forma subclínica, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere, mas sim em sua composição (3). Entre as principais alterações na mastite subclínica, destaca-se o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS), o aumento dos teores de Cl^- , Na^+ , proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, sólidos totais e lactose do leite (20).

As mastites também podem ser classificadas, de acordo com o agente etiológico, em ambiental e contagiosa. Os patógenos mais comuns causadores de mastite ambiental são *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e a *Klebsiella* sp. presentes no ambiente, considerados microrganismos oportunistas, ubiqüitários e não adaptados a sobrevivência no interior do hospedeiro. Já os causadores de mastite contagiosa mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos, causando infecções subclínicas que se manifestam pela elevação da CCS dos quartos infectados. As mastites clínicas são normalmente do tipo ambiental e as subclínicas geralmente do tipo

contagiosa. Nos rebanhos brasileiros as mastites subclínicas são as que causam maior prejuízo à exploração leiteira (21).

Staphylococcus aureus é um dos patógenos de maior importância. Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* são de grande preocupação pela produção de toxinas que contribuem para a patogênese da mastite (22). Os principais reservatórios desta bactéria são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e tetos (23). Langoni et al. (24) afirma que a mastite é um dos fatores que não permitem que o produtor atinja a qualidade exigida pelo governo (24).

Langoni et al (25) e Pinheiro de Sá et al (26) confirmam os *Staphylococcus* spp. como agentes importantes na mastite clínica e subclínica em bovinos, sendo que os microrganismos com maior frequência na mastite foram *Corynebacterium bovis* (29,52%), *Streptococcus dysgalactiae* (11,9%) e *Staphylococcus aureus* (10,48%) embora o terceiro seja o mais patogênico.

As medidas de controle para a mastite subclínica tem recebido grande atenção, pois esta forma tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros porque sua prevalência é maior que a da forma clínica (27). Segundo Beloti et al (28), no Norte do Paraná os casos de mastite bovina subclínica são frequentemente causados pelo patógeno primário *Staphylococcus aureus*.

2.2.1 Diagnóstico da Mastite

Os métodos mais comumente utilizados para o diagnóstico de mastite clínica são o teste da caneca do fundo negro ou prova de Tamis e análise criteriosa da glândula mamária. Já a mastite subclínica necessita de exames específicos para sua identificação (27), podendo ser diagnosticada por exames microbiológicos, *Califórnia Mastitis Test* (CMT) ou pela Contagem de Células Somáticas (CCS).

Através de análises microbiológicas do leite, é possível a identificação correta do agente etiológico. Com isso podemos determinar prováveis fontes de infecção, e adotar medidas específicas de controle (28).

O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas do leite, sob a ação de um detergente aniônico capaz de romper a membrana celular (29). Segundo Oliveira et al (30), o CMT é uma ferramenta de diagnóstico imprescindível na propriedade leiteira, sendo um indicativo de manutenção ou descarte de vacas do rebanho. É usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica, tendo a vantagem de poder ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados (31).

A CCS estima o número de células somáticas presente na amostra de leite (25). Segundo Cunha (32) há correlação negativa entre CCS e produção de leite, quanto maior a CCS menor a produção, e positiva entre CCS e porcentagens de gordura e de proteína.

2.2.2 Prevenção da Mastite

Para a prevenção da mastite, é necessária atenção na fonte de infecção, com identificação dos animais com mastite clínica e subclínica para tratamento, eliminação dos animais com infecção crônica, seleção dos animais mais resistentes e fornecimento de uma alimentação equilibrada. O controle da inocuidade do leite só é possível desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio do alimento (33). Para evitar a contaminação, são necessários medidas de manejo e higiene na ordenha e um ambiente seco e limpo para os animais (3).

Segundo Müller (3), para a prevenção e controle da mastite os seguintes pontos são fundamentais:

- Mão de obra especializada: treinamento sobre higiene, fisiologia de lactação, funcionamento e manutenção dos equipamentos de ordenha;
- Monitoramento: análises constantes de CCS, teste da caneca, CMT, índices de mastite, perfil microbiológico e resistência a antimicrobianos;

- Higiene: manutenção do ambiente, mantendo seco e confortável, com instalações adequadas com piquetes, sombra, dimensão de acordo com o sistema de confinamento, natureza da cama e baias;
- Tratamento: imediato para os animais com mastite clínica com coleta e avaliação do leite para comprovação de eficácia e tratamento das vacas secas para curar a mastite subclínica e evitar novas infecções no período seco;
- Eliminação: as vacas com infecções crônicas devem ser descartadas;
- Manejo e higiene: a ordenha é o momento mais importante de controle da mastite, deve ser realizada por pessoas qualificadas e com uma rotina pré-estabelecida envolvendo o teste da caneca, limpeza dos tetos com água clorada, imersão dos tetos em solução anti-séptica por 30 segundos, secagem dos tetos, retirada dos insufladores, imersão dos tetos em solução anti-séptica, desinfecção dos insufladores e ordem de ordenha;
- Higienização e manutenção dos equipamentos: a limpeza do equipamento deve ser feita com enxague em água morna, enxague com água e detergente alcalino clorado, enxague ácido e santificação pré-ordenha;
- Vacinação: é uma medida complementar. No mercado há vacinas para mastite ambiental e para prevenção da mastite por *S. aureus*.

2.3 STAPHYLOCOCCUS SPP.

A bactéria *Staphylococcus* foi nomeada por Ogston em 1881 ao observar um conjunto de bactérias no pus dos abscessos humanos no formato de cachos de uva. Segundo Gomes (34), na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* existem 47 espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus*.

De acordo com Koneman et al (35), o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* cita o gênero *Staphylococcus* (do grego *staphyle* = cacho de uvas e *coccus* = semente ou grão) pertencente à família *Micrococcaceae*. O microrganismo se apresenta em forma de cocos gram

positivos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, o agrupamento forma cachos pela sua divisão ser em todos os planos. As colônias têm de 1 a 2 mm de diâmetro, são imóveis, sem esporos, opacas, convexas, cremosas e podem ser brancas ou amarelas, de acordo com a espécie.

Segundo Kloss e Lambe (36), dependendo da espécie as bactérias catalase e termonuclease positivas, pertencentes a este gênero, podem ser estafilococos coagulase positivas (ECP) ou estafilococos coagulase negativas (ECN) dependendo da espécie.

2.3.1 Estafilococos Coagulase Positiva (ECP)

A produção da enzima coagulase é um fator de virulência dos estafilococos. Esta enzima coagula o sangue ao transformar o fibrinogênio em fibrina. A capacidade da formação de coágulo em volta da bactéria dificulta o seu reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema imunitário (19).

Na rotina do exame microbiológico para diagnóstico de mastite, o teste de produção de coagulase em tubo é empregado para classificar os *Staphylococcus* em dois grupos: ECP e os ECN. A coagulase positiva é identificada através do teste em laboratório com plasma de coelho. A bactéria é inoculada em um tubo com o plasma e se este coagular, o resultado é positivo e indica ECP (37).

Das espécies de estafilococos, somente 5 são capazes de produzir coagulase livre e são de importância veterinária: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. schleiferi*. E destas o *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus* são os mais frequentes isolados na mastite (35;37).

O *S. hyicus* são encontrados em diversas espécies, causam epidermite exsudativa em suínos e, algumas vezes mastite bovina. O *S. aureus* é um agente piogênico comum em humanos e em diferentes espécies animais, é um importante patógeno bacteriano (38), considerado o terceiro maior causador de doenças alimentares (39;40). Sua principal transmissão é pelo gado leiteiro com mastite, podendo contaminar o alimento durante ou após o manuseio

inadequado, além da refrigeração deficiente propiciar a propagação e crescimento do micro-organismo (41).

2.3.2 Identificação dos ECP

Uma correta identificação de *S. aureus* na mastite bovina é imprescindível tanto do ponto de vista epidemiológico quanto da prevenção das infecções incluindo a imunoprofilaxia (42). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* apresentam características morfológicas e bioquímicas extremamente semelhantes (43).

Para a diferenciação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* pode ser utilizado o teste de fermentação do manitol. É utilizado o meio de ágar manitol sais, contendo 1% de manitol, 7,5% NaCl, vermelho de fenol e peptonas. Com a alta concentração de sais, somente o *S. aureus* cresce e apresenta uma zona amarela ao redor das colônias isoladas, devido a produção de ácido a partir do manitol. Mas deve ser observado que outras espécies de estafilococos, pouco frequentes, também produzem ácido a partir do manitol e deve se complementar com isolamento do meio. Os microrganismos devem ser repicados em ágar sangue e identificada a produção de coagulase (35).

2.3.2.1 Biologia Molecular na Diferenciação dos Estafilococos

Técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Figura 1), também podem identificar ECP precisamente, sendo um método confiável, rápido e altamente discriminatório (44). Essa técnica permite recriar grande quantidade de um gene a partir de uma parte ínfima de DNA (45). Em questão de algumas horas, PCR pode fazer bilhões de cópias de um segmento específico do DNA. A análise da PCR é utilizada com iniciadores específicos direcionados a fragmentos com diferentes pesos moleculares (46).

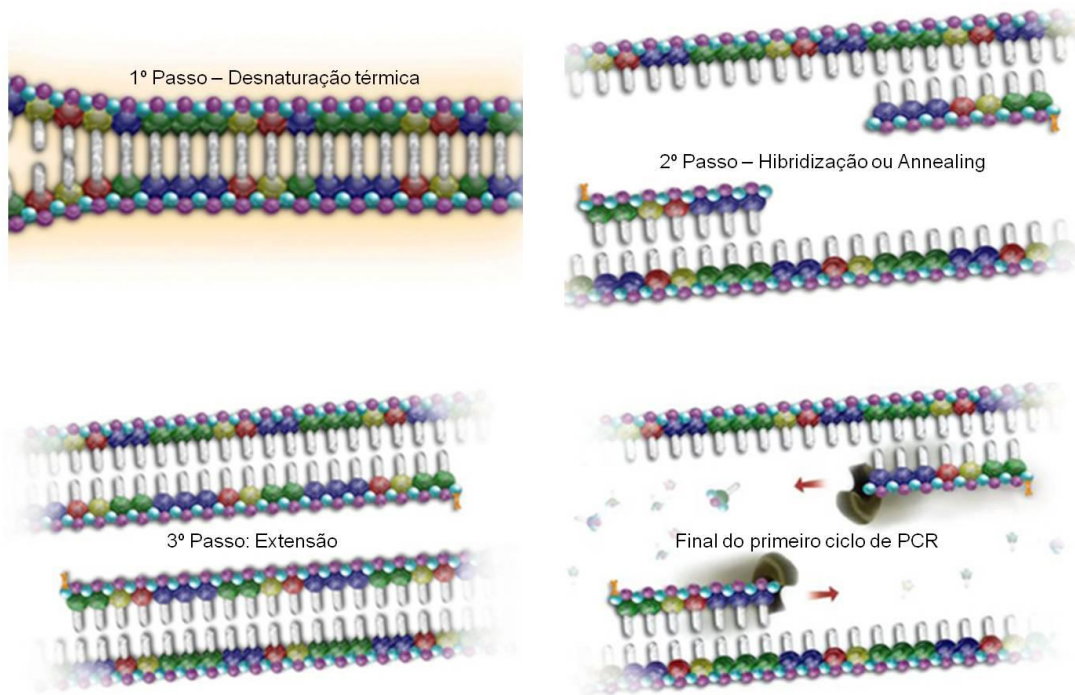


Fig. 1: Fluxograma da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (47)

O polimorfismo genético é a ocorrência de mais de uma base em posições da sequência de DNA. Essa variabilidade, quando ocorre em regiões reguladoras de genes, pode influenciar na ocorrência de doenças. Para a detecção do polimorfismo, o método padrão é o PCR-RFLP, utilizando enzimas de restrição para reconhecer sequência de bases específica na dupla-hélice do DNA e clivar ambas as fitas em sítios determinados (26).

A produção da enzima coagulase é um importante fator de patogenicidade usado no mundo inteiro para identificação de *Staphylococcus aureus*. Goh et al (48) e Rodrigues da Silva e Silva (49) utilizaram a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) direcionado ao gene da enzima coagulase para determinar diferenças em estafilococos coagulase positiva no conteúdo genético e identificar mudanças no comportamento epidemiológico do agente. Ambos autores consideraram a técnica com alto grau de discriminação.

2.4 VACINAS

A vacina e as campanhas de vacinação se iniciaram há mais de mil anos. As primeiras bases científicas foram estabelecidas em 1796, pelo médico inglês Edward Jenner, com a retirada do vírus da varíola bovina das pústulas de vacas doentes e inoculação em camponeses ingleses para proteção contra a doença. Durante 9 décadas nada mais se desenvolveu, até Louis Pasteur, no final do século XIX compreender os microrganismos e as infecções após várias experiências em animais, no qual provocava a doença de forma atenuada e assim ajudava o animal a se defender de formas mais graves da doença. Após estes estudos as vacinas passaram a ser constantemente desenvolvidas (50).

A vacinação em vacas com mastite ocasionam o aumento na capacidade de resposta imune da vaca contra um agente patogênico. Os programas de vacinação podem ser usados para aumentar a resistência da vaca contra um agente específico. Estudos demonstram que as vacinas contra mastite apresentam resultados variáveis, pois são causadas por uma grande variabilidade de microrganismos (51).

As vacinas são consideradas medidas complementares no programa de controle e profilaxia da mastite bovina. Podendo reduzir, em alguns casos, a prevalência e a gravidade dos quadros clínicos. Podem ser usadas vacinas autógenas, produzidas a partir de patógenos isolados da própria fazenda ou vacinas comerciais já existentes no mercado (3;52).

2.4.1 Vacinas Comerciais

Os primeiros estudos com vacinas comerciais contra mastite causada por *S. Aureus* foram feitos na Nova Zelândia. Os resultados deste estudo permitem concluir que ainda que a vacinação de vacas de leite não reduziu a incidência de mastite causada por *S. Aureus* pode-se observar aumento da taxa de cura espontânea deste agente (53). Esta mesma vacina foi estudada na Estação de Pesquisa da Universidade Estadual da Louisiana e obtiveram os mesmos resultados (54).

O uso de vacinas comerciais de *S. aureus* associado ao tratamento microbiológico para controle da mastite crônica em vacas leiteiras foi estudado por Smith, Lyman e Anderson (55) com resultados satisfatórios. Resultados discordantes foram obtidos por Middleton, Luby e Adams (56) ao testarem uma vacina comercial onde não observaram diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle, no entanto em ambos os trabalhos foram somente observadas características da produção e CCS.

2.4.2 Vacinas Autógenas

A ideia da utilização de vacinas produzidas a partir dos agentes infecciosos isolados de um dado paciente para promover a cura desse mesmo paciente foi desenvolvida no início do século XX por Sir Almroth Edward Wright. Estas vacinas são conhecidas como vacinas autógenas, podem ser classificadas como monovalentes ou polivalentes, produzidas com microrganismos isolados de animais sacrificados ou enfermos, sendo estas inativadas, imunogênicas, não tóxicas e inócuas, utilizadas no controle e prevenção de enfermidades da espécie alvo (57).

Uma vez que as vacinas autógenas são produtos inativados é adicionado um adjuvante, usualmente o hidróxido de alumínio, com o objetivo de induzir uma resposta imunitária adequada nos animais aos quais são aplicadas (58). Pode ser utilizado como adjuvante ao hidróxido de alumínio, o cloreto de dimetildioctadecilamônio (DDA), para potencializar a resposta imune humoral.

A IN nº 31, de maio de 2003 aprova o regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas autógenas, porém a potência e eficácia de vacinas autógenas não são estabelecidas (59). Com isso estudos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a eficácia.

Em estudo realizado num efetivo de bovinos leiteiros com o objetivo de determinar a eficácia de uma vacina autógena no tratamento da mastite subclínica por *Staphylococcus aureus*, obtiveram-se os seguintes resultados: aumento da taxa de curas, redução da gravidade das infecções e prevenção da ocorrência de novas infecções (60).

ARTIGO

EFEITO PROTETOR DA VACINA AUTÓGENA SOBRE OS ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ISOLADOS DE MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA

EFFECT VACCINE SHIELD AUTOGENIC ABOUT COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS SUBCLINICAL CASES

(Submetido ao periódico Semina: Ciências Agrárias)

RESUMO

A mastite bovina é a doença que mais acomete bovinos leiteiros. Caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária frente a diversas agressões, sendo que 90% são causadas por bactérias. O controle dessa doença através da vacina resulta numa proteção modesta, o que tem inibido a utilização de vacinas pelos criadores. Resultados positivos e negativos são encontrados quanto ao uso de vacinas para mastite. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito protetor da vacina autógena contra os estafilococos coagulase positiva isolados de bovinos com mastite subclínica. Foram analisados 72 quartos mamários através do CMT para diagnóstico da mastite subclínica. As amostras positivas para a presença de estafilococcus, foram submetidas ao teste bioquímico da coagulase e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a confirmação dos Estafilococos Coagulase Positivas (ECP). A *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) foi realizada para identificação dos padrões polimórficos presentes no gene da coagulase. A vacina foi produzida com os agentes ECP, e os animais foram vacinados com 2 doses de 5ml via subcutânea com 30 dias de intervalo. Após 90 dias da vacinação, todos os testes foram refeitos para avaliar alterações no polimorfismo genético. Concluindo-se que a vacina teve efeito profilático, pois não houve a incidência de novos microorganismos confirmados pelo polimorfismo, e curativo pois duas espécies de ECP foram erradicadas.

Palavras-chave: PCR. RFLP. *Staphylococcus spp.*. Polimorfismo.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease that affects more dairy cattle. It is characterized by inflammation of the mammary gland forward to several assaults, and 90% are caused by bacteria. Control of this disease from the vaccine results in a modest protection, which has inhibited the use of vaccines by the creators. Positive and negative results are found in the use of vaccines for mastitis. The objective was to evaluate the protective effect of autogenous vaccine against coagulase positive staphylococci isolated from cattle with subclinical mastitis. We analyzed 72 breast room through the CMT for diagnosis of subclinical mastitis. The samples positive for the presence of staphylococcal were

1 subjected to biochemical and coagulase test the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), for
2 confirmation of *Staphylococcus* Coagulase Positive (ECP). The Restriction Fragment Length
3 Polymorfism (RFLP) was performed to identify the polymorphic patterns present in the coagulase
4 gene. The vaccine was produced with ECP agents, and the animals were vaccinated with two doses of
5 5 ml subcutaneously with 30-day interval. After 90 days of vaccination, all the tests were redone to
6 evaluate changes in the genetic polymorphism. In conclusion that the vaccine has prophylactic effect,
7 as there was no incidence of new polymorphism confirmed by microorganisms, and curative for two
8 species of ECP were eradicated.

9 **Key words: PCR. RFLP. *Staphylococcus* spp.. Polymorphism.**

10 INTRODUÇÃO

11 A inflamação da glândula mamária ou mastite é considerada uma das doenças mais comuns em
12 gado leiteiro. Esta se caracteriza por um processo inflamatório, geralmente de caráter infeccioso,
13 causado pelos mais diversos agentes. A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica. A
14 mastite clínica resulta em mudanças no aspecto da secreção láctea, mudanças visíveis no tecido
15 mamário e alguns efeitos sistêmicos. A mastite subclínica não apresenta alterações macroscópicas
16 detectáveis, porém apresenta alterações microbiológicas e químicas do leite. Esta forma é
17 normalmente a mais prevalente, responsável por aproximadamente 70% das perdas (PRESTES et al.,
18 2003;MÜLLER, 2002).

19 A mastite é um dos fatores que não permitem que o produtor atinja a qualidade exigida pelo
20 governo (LANGONI et al., 2011) e a infecção por estafilococos ocasiona prejuízos consideráveis aos
21 produtores e à indústria leiteira (PORTES et al., 2006). Vários agentes podem causar a mastite bovina,
22 mas o *Staphylococcus* spp. é um dos patógenos de maior importância. Para lidar com este problema, a
23 vacinação para prevenir a mastite por *S. aureus* tem sido objetivo de estudo de muitos investigadores
24 (HWANG et al., 2000).

25 O controle dessa doença através da vacina resulta numa proteção modesta, o que tem inibido a
26 utilização de vacinas pelos criadores (LANGONI et al., 1998). Resultados positivos e negativos são
27 encontrados na literatura quanto ao uso de vacinas para mastite.

28 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da vacina autógena contra estafilococos
29 coagulase positiva isolados de bovinos leiteiros com mastite subclínica.

30 MATERIAL E MÉTODOS

31 *Local e animais*

1 O estudo foi realizado entre novembro de 2013 a maio de 2014, em uma propriedade leiteira no
2 município de Inajá Noroeste do Paraná, composto por vacas mestiças, com produção considerada
3 média a alta de 18 kg de leite por dia. Os animais são ordenhados duas vezes ao dia com intervalo de
4 12 horas em equipamento mecânico tipo espinha de peixe com 8 conjuntos. Setenta e dois quartos
5 mamários foram submetidos ao *California Mastitis Test* (CMT) como triagem para identificação da
6 mastite subclínica. A leitura foi feita de acordo com Santos e Fonseca (2000). Trinta e quatro quartos
7 apresentaram 3 cruces no resultado, as amostras foram coletadas e encaminhadas até o Laboratório de
8 Microbiologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

9 *Avaliação microbiológica*

10 As amostras de leite foram estriadas nas placas de ágar com alça de platina e foram incubadas em
11 estufa a 37°C por 24h. A cultura foi realizada em ágar sangue (Columbia Bood Ágar – Difco)
12 adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril.

13 As colônias obtidas foram identificadas e classificadas quanto à coloração, tamanho, aspecto e tipo
14 de hemólise, e foram submetidas a verificação morfológica em esfregaços corados pelo método de
15 Gram segundo Koneman et al. (2012). As colônias classificadas como *Staphylococcus* spp. foram
16 submetidas a testes para produção de enzimas catalase e coagulase (plasma de equino) segundo Silva
17 et al. (1997) e fermentação aeróbica e anaeróbica do manitol segundo Mac Faddin (1980) para
18 diferenciar *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.

19 *Diagnóstico molecular*

20 *1 Extração do DNA*

21 A extração do DNA das amostras de ECP para produção da PCR foi realizada como descrito a
22 seguir. As amostras foram congeladas por 15 minutos e descongeladas em água a 40°C, por duas
23 vezes. Após, foram adicionados 375 µL de Trizol e homogeneizado em Vortex. Observou-se se o
24 fragmento da bactéria foi misturado, e foi adicionado 100 µL de Clorofórmio, homogeneizou-se em
25 Vortex e manteve-se de 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a
26 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Foi desprezada a fase aquosa. Ao depósito contendo o DNA foi
27 adicionado 150 µL de etanol 100%, homogeneizado manualmente e após foi mantido de 2 a 3 minutos
28 em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos a 4°C. O
29 sobrenadante foi desprezado. O depósito contendo o DNA foi lavado com 500 µL de citrato de sódio
30 e aguardamos por 30 minutos, e as amostras centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos a 4°C. Foi
31 descartado o sobrenadante novamente e lavado com citrato de sódio repetindo as etapas seguintes. Foi
32 adicionado 1.000 µL de etanol 75% e mantido por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras

1 foram centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram
2 secas com os microtubos invertidos. Os depósitos contendo o DNA foram ressuspensos em 50 µL de
3 solução Tris-EDTA (TE) estéril e mantidos refrigerados.

4 2 PCR

5 Para a confirmação da prova bioquímica da coagulase foi realizada a Reação em Cadeia da
6 Polimerase (PCR) com a amplificação do gene da enzima coagulase (coagen) com uso de primer
7 utilizado por Aarestrup et al. (1995) sendo COAG2 (5' ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') ;
8 e COAG3 (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3'). As reações de amplificação foram preparadas
9 para um volume final de 25 µL contendo: 1 a 2 µg de DNA alvo (350 ng µL), 1µL de primer (50
10 pmol), 5 µL do mix de nucleotídeos trifosfatos (200 µM cada) contendo 2mM de MgCl₂, 0,1 µL de
11 taq polimerase (1 U) e 3 µL de tampão PCR 10x (500mM de KCL; 100 mM de Tris-HCL, pH 8,4; 1%
12 de triton x-100; e 50mM de MgCl₂).

13 A amplificação foi realizada em um termociclador (Biocycler) com seguinte protocolo: 94°C por 3
14 min para desnaturação inicial, 30 ciclos de 95°C por 50 segundos para desnaturação, 59°C por 1
15 minuto para anelamento, 72°C por 1 min e 40 seg para extensão e 72°C por 7 minutos para extensão
16 final. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% (m v), corados com
17 brometo de etídio (15 mg mL), visualizados e fotografados em transiluminador de ultravioleta (UV).

18 3 RFLP

19 Nas amostras que apresentaram o gene da enzima coagulase foi realizada também a *Restriction*
20 *Fragment Length Polymorfism* (RFLP), como preconizado por Goh et al. (1992) e Rodrigues da Silva
21 e Silva (2005), resumidamente: lisado de células bacterianas cultivadas em TSB (tripcase soy broth –
22 Difco), centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos, o depósito foi lavado com 500 µL de tampão TE
23 (10mM tris-HCL, pH 7,5; 1mM EDTA) e centrifugado novamente. O RFLP e o produto do PCR
24 (DNA amplificado que codifica a enzima coagulase) foram digeridos pela enzima de restrição AluI
25 (Invitrogen) seguindo as indicações do fabricante (10 µL do produto do PCR e 10 U de AluI). Em
26 seguida foram incubadas em um termociclador a 37°C por uma hora. O DNA amplificado e digerido
27 foi separado em gel de agarose a 2% com 10 mg mL de brometo de etídio e o produto da corrida
28 fotografado sob luz UV.

29 *Produção da vacina*

30 Os agentes isolados e classificados estafilococos coagulase positiva (ECP) pela prova bioquímica,
31 foram submetidas a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Tabela 1), para confirmação
32 da presença da enzima coagulase. Após confirmação, as colônias foram coletados com alça de platina

1 e cultivados em tubo de ensaio contendo 10ml de meio BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®) a 37°
2 C por 24 h. As amostras foram unidas em um único frasco estéril, formolizadas a 0,5% (v v) e
3 inativadas 37° C por 48h. Como adjuvantes foram utilizados 5mg mL de gel de hidróxido de alumínio
4 (Buschle & Lepper) e 5 mg mL de DDA (Cloreto de dimetildioctadecilamônio) segundo Silva et al.
5 (2004). A esterilidade da vacina produzida foi determinada como indicado na British Pharmacopoeia
6 (1985). Após a produção, a vacina foi envasada em frascos de 100ml e levada a propriedade sob
7 refrigeração.

8 Os animais foram vacinados após 45 dias da colheita das amostras de leite. Foram aplicadas 2
9 doses de 5 mL pela via sub cutânea com 30 dias de intervalo. Não foram observadas reações locais ou
10 sistêmicas. As amostras de leite foram colhidas após 90 dias da vacinação para que todos os testes
11 fossem refeitos.

12 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

13 Foram analisados 72 (100%) quartos mamários através do CMT. Antes da aplicação da vacina
14 autógena 34 (47,2%) quartos apresentaram CMT positivo indicando mastite subclínica. Dessas
15 amostras 14 apresentaram crescimento em cultura e 11 foram classificadas como *Staphylococcus* spp..
16 Após 90 dias da aplicação da segunda dose da vacina, 23 (31,9%) quartos apresentaram resultado
17 positivo. Todas amostras apresentaram crescimento em cultura sendo que 18 foram classificadas como
18 *Staphylococcus* spp..

19 A Tabela 1 demonstra a diminuição de *S. aureus* após utilização da vacina tanto no número de
20 agentes, apresentando queda de 34,3%, quanto os *S. aureus* coagulase positiva que chega a
21 erradicação. Contudo houve um aumento na quantidade de *S. hyicus* de 43,3%, entretanto esta espécie
22 coagulase positiva se manteve como confirma a PCR. Foi encontrado um teto com *S. intermedius*
23 coagulase positiva na primeira colheita e na segunda colheita essa espécie não foi encontrada.

24 Antes da aplicação da vacina, 09 tetos apresentaram infecção por ECP no teste da coagulase, mas
25 apenas 08 tetos obtiveram amplificação do gene da enzima coagulase pela PCR. Sendo que 06 dos
26 isolados apresentaram um produto de amplificação de 650 pares de base (pb) (P1), e 02 obtiveram
27 amplificação de 700 pb (P2) para o gene da coagulase (Figura 1). Após a vacinação 02 tetos
28 apresentaram infecção por ECP, sendo que os dois foram confirmados pela avaliação molecular. Os
29 dois isolados amplificaram com 650 pb.

30 A visualização sob luz ultravioleta, do polimorfismo do gene da *coa* de ECP, separados por
31 eletroforese na RFLP, nos demonstra a presença de diferentes tamanhos de fragmentos de restrição do
32 DNA específico (Figura 1). Foram encontrados dois perfis polimórficos antes da vacinação, P1= 655-
33 698pb, P2= 705-747pb. Especificamente 7 tetos apresentaram o perfil P1, sendo que deles 4 eram *S.*

1 *aureus*, 2 *S. hyicus* e um *S. intermedius*, e 1 teto apresentou o perfil P2 sendo *S. aureus*. Após a
2 vacinação, apenas 2 tetos foram considerados coagulase positiva sendo *S. hyicus*, e os dois possuíam o
3 perfil P1.

4 **CONCLUSÕES**

5 O CMT é um teste rotineiramente utilizado, pois contribui para que medidas de manejo dos animais
6 e na linha de ordenha sejam adotadas para garantir máxima produção e qualidade do leite. No presente
7 estudo, dos 72 quartos analisados pelo CMT, 47,2% apresentaram resultado positivo indicando mastite
8 subclínica, antes da utilização da vacina. Resultado semelhante aos encontrados por Freitas et al.
9 (2005), com pesquisa realizada no Agreste do Estado de Pernambuco que relata 57,1% dos animais
10 com mastite subclínica. Bandeira et al. (2013) identificou 53,6% de mastite subclínica através do CMT
11 em estudo realizado na região Sul do Rio Grande do Sul.

12 Dos 34 tetos que obtivemos resultado positivo no CMT, 41,1% apresentaram crescimento em
13 cultura. Ribeiro et al. (2003) relataram 64,5% das amostras positivas no CMT com crescimento
14 bacteriano, valor inferior ao encontrado por Beloti et al. (1997) que demonstra 75,6% das amostras
15 com crescimento. Sendo assim, as amostras de leite mastítico positivas no CMT e negativas no teste
16 microbiológico podem se tratar de mastite subclínica não infecciosa.

17 Ainda analisando o CMT do leite, após vacinação, os animais lactantes, apresentaram queda de
18 15,3%. Alberton et al. (2001) na região metropolitana de Curitiba, demonstra maiores percentuais na
19 queda do CMT, após utilização de vacina autógena, produzida apenas com cepas de *S. aureus*
20 coagulase positiva isoladas de mastite subclínica. Entretanto os animais receberam doses semanais da
21 vacina, por via subcutânea na região do linfonodo mamário, durante 16 semanas.

22 Em um estudo realizado por Lange et al. (2011) no Estado de Minas Gerais, com o objetivo de
23 identificar, através da PCR, espécies coagulase positivas de *Staphylococcus* isolados de mastite
24 bovina, a espécie mais frequente foi *S. aureus*. No presente trabalho, a espécie coagulase positiva mais
25 encontrada também foi *S. aureus* (62,5%), seguido por *S. hyicus* 25% e o *S. intermedius* 12,5%.
26 Brito et al. (2002) examinou 49 amostras de ECP isolados de vacas com mastite subclínica de 25
27 rebanhos leiteiros, mostrando também a maior ocorrência de *S. aureus* (77%) seguido por *S. hyicus*
28 (22%) e *S. intermedius* não foram identificados em nenhuma amostra.

29 Lo Turco (2013) com estudo realizado em quantificação e identificação genotípica do gene da *coa*
30 de *Staphylococcus aureus*, demonstra que o teste bioquímico não é totalmente preciso, pois obtiveram
31 resultados controversos com a aplicação da técnica da PCR. De 22 amostras positivas para a coagulase
32 em teste bioquímico, apenas 8 amplificaram o gene da *coa* em gel de agarose, corroborando com os

1 resultados encontrados neste trabalho, onde 09 amostras foram dadas como coagulase positiva no teste
2 da coagulase mas apenas 08 foram confirmadas pela PCR.

3 A genotipagem por PCR-RFLP de gens, demonstram a importância dos estudos que utilizam
4 métodos moleculares para a diferenciação e identificação de microorganismos mais precisos, pois com
5 esses testes é possível conduzir estudos voltados para prevenção e tratamentos mais eficazes. As
6 amostras que amplificaram o gene da *coa* na PCR, produziram dois perfis genotípicos antes da vacina.
7 Sete amostras apresentaram o perfil P1=650 pb e uma amostra o perfil P2=700 pb.. Resultados que
8 corroboram com Freitas et al. (2005), que em pesquisa com o mesmo gene de *S. aureus* pela PCR
9 também apresentou dois perfis diferentes (P1= 750 pb e P2= 1000 pb). Depois da vacinação apenas
10 duas amostras amplificaram o gene *coa*, e as duas com perfil P1. Sendo assim, a PCR nos confirma
11 que os agentes *S. aureus* e *S. intermedius* não persistiram com a vacinação, e o *S. hyicus* coagulase
12 positiva se mantiveram.

13 Após clivagem pela enzima AluI durante RFLP, foram encontrados 2 padrões polimórficos (P1 e
14 P2) de ECP, antes da vacinação. Sendo que 7 agentes apresentaram o perfil P1 como polimorfismo, e
15 2 agentes apresentaram o perfil P2. Já pós-vacinação, apenas dois agentes ECP foram encontrados
16 com o padrão polimórfico P1. Demonstrando que a vacina teve efeito profilático, pois não houve a
17 incidência de novos casos, e curativo sendo que duas espécies de ECP foram erradicadas.

18 Considerando que a vacina teve efeito profilático, pois não houve a incidência de novos
19 polimorfismos, e curativo sendo que duas espécies de ECP foram erradicadas, concluímos que a
20 vacina autógena para bovinos leiteiros com mastite subclínica, apresentou efeito.

21 REFERÊNCIAS

- 22 AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic
23 methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in
24 Denmark. V. 45, p. 139-150. Vet. Microbiol., 1995.
- 25 ALBERTON, L.R.; WERNER, P.R.; CUNHA, L.; WARTH, J.F.; FARACO, A.P.P.A.; RIBAS, N.P.
26 Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. N.
27 4(1), p. 31-40, jan-jun. Arq. Ciênc. Vet. Zool., UNIPAR, 2001.
- 28 BANDEIRA, F.S.; PICOLI, T.; ZANI, J.L.; DA SILVA, W.P.; FISCHER, G. Frequência de
29 *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul.
30 Arq. inst. biol., n. 80(1), p.1-6, 2013.
- 31 BELOTI, V.; MÜLLER, E.E.; DE FREITAS, J.C.; METTIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em
32 rebanhos leiteiros no norte do Paraná. N. 18(1), p. 45-53. Semina: Ciências Agrárias, 1997.
- 33 BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de
34 estafilococos coagulase-positiva isolados de mastite bovina. Ciência Rural, v.32, n.1, p.79-82, 2002.

- 1 DE FERREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELA, S.S.A.; DA SILVA,
2 D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; DE SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de
3 sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas
4 com mastite no agreste do estado de Pernambuco. v.72, n.2, p.171-177, abr./jun. São Paulo: Arq. inst.
5 biol., 2005.
- 6 GOH, S.; BYRNE, S.K.; ZHANG, J.L.; CHOW A.W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on
7 the basis of coagulase gene polymorphism. Journal of Clinical Microbiology, n. 30, p. 1642 – 1645,
8 1992.
- 9 HWANG, C.Y.; PAK, S.I.; HAN, H.R. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with
10 *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. Journal of veterinary medical science, n. 62(8), p. 875-
11 880, 2000.
- 12 KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.D.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C.
13 Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,
14 2012.
- 15 LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.;
16 DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para
17 identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. N. 31(1), p. 36-40,
18 janeiro. Pesq. Vet. Bras., 2011.
- 19 LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite
20 bovina: flora bacteriana aeróbica. Revista brasileira de medicina veterinária, n. 20, p. 204–209, 1998.
- 21 LANGONI H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS,
22 P.Y.; LUCHEIS, S.B.; MENOZZI, B.D.; DA SILVA, A.V. Aspectos microbiológicos e de qualidade
23 do leite bovino. V. 13, n. 12. Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira, 2011.
- 24 LO TURCO, R.O. Quantificação e identificação genotípica do gene *coa* de *Staphylococcus aureus* a
25 partir de queijos e embutidos. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos). Londrina:
26 UTFPR, 2013.
- 27 MAC FADDIN, J.F. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2ª edição. Baltimore:
28 Williams & Wilkins, 1980.
- 29 MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Maringá: Anais do II
30 Sul-leite - Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil, p. 206-217,
31 2002.
- 32 PRESTES, D.S.; FILLAPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam –
33 uma revisão. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003.
- 34 PORTES, V.M.; WOLFF, C.; VAZ, A.K.; DICK, W. Efeito da vacinação contra a mastite
35 estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* spp. a células do leite. Acta Scient. Vet.
36 34(2):137-141, 2006.
- 37 RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES,
38 J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica
39 infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul.
40 Revista Brasileira de Agrociência, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

- 1 RODRIGUES, S.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows
2 with mastitis in southern Brazil. Canadian journal veterinary research, n. 69, p. 260 – 264, 2005.
- 3 SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Qualidade do leite e controle de mastite. Lemos editorial: 2000.
- 4 SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica
5 de alimentos. São Paulo: Varela, 1997.
- 6 SILVA, L.C.D.; Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Avaliação da capacidade adjuvante
7 do cloreto de dimetildioctadecil-amônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta
8 imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarréia viral bovina. Brazilian journal of
9 veterinary research in animal science, n. 41(3), p. 201-206, 2004.
- 10 STATIONERY OFFICE HM – BRITISH PHARMACOPEIA (VETERINARY). Published on the
11 recommendation of the Medicines Commission Pursuant to the Medicine Act 1968. 2ª edição. Great
12 Britain Medicines Commission, 1985.

13

- 14 Tabela 1. Presença de *Staphylococcus* spp. e a capacidade de produção da enzima coagulase (teste
15 bioquímico e PCR) em leites provenientes de vacas com mastite subclínica antes (AV) e após (PV) o
16 uso de vacina autógena.

Agente etiológico	AV	PV	AV	PV	AV	PV
	(n)		ECP/ TB		ECP/PCR	
<i>S. aureus</i>	5	2	5	0	5	0
<i>S. hyicus</i>	5	6	3	2	2	2
<i>S. intermedius</i>	1	0	1	0	1	0
TOTAL	1	8	9	2	8	2

- 17 Legenda: ECP/TB= Estafilococos Coagulase Positiva pelo Teste Bioquímico, ECP/PCR= Estafilococos
18 Coagulase Positiva pela Reação em Cadeia da Polimerase

19

20

21

22

23

24

25

26

27

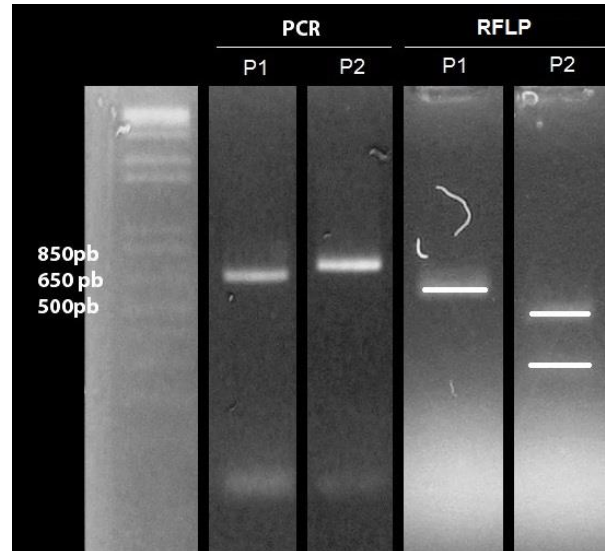
28

29

30

31

1 Figura 1. Perfis eletroforéticos representativos dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase
 2 (PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP) do gene *coa* de estafilococos coagulase
 3 positiva (ECP).



4

5 Tabela 2. Agentes etiológicos e o perfil da *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP) do gene
 6 coagulase positiva isolados do leite de vacas com mastite sub-clínica antes da vacinação e 90 dias após
 7 a vacinação.

	Antes da vacinação		Pós-vacinação	
	P1	P2	P1	P2
<i>S. aureus</i>	04	01	--	--
<i>S. hyicus</i>	02	--	--	02
<i>S. intermedius</i>	01	--	--	--
Total	07	01	--	02

8 Legenda: P1= Perfil Polimórfico 1, P2= Perfil Polimórfico 2

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.
2. Prestes, DS, Filappi, A, Cecim, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003.
3. Müller, EE. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Maringá: Anais do II Sul-leite - Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil, p. 206-217, 2002.
4. Bandeira FS, Picoli T, Zani JL, Da Silva WP, Fischer G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. Arq. inst. biol., n. 80(1), p.1-6, 2013.
5. Santos LL, Pedroso TFF, Guirro E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. Ciência animal brasileira, 11(4), p. 860-866, 2010.
6. Franco, RM. Atlas de microbiologia de alimentos. Rio de Janeiro: Editora da UFF, 2012.
7. Trabulsi LR, Toledo MRF. Microbiologia. 2ª edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.
8. Luz, IS. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Recife: Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.
9. Silva HC. Polimorfismo do DNA: diversidade e doença. Genética médica, 2009. Disponível em: URL: http://www.uc.pt/en/fmuc/phdhs/Courses/genetics/Slides_1.pdf.
10. Chiareli D, Cosate MRV, Moreira EC, Leite RC, Lobato FCF, Silva JA, Teixeira JFB, Marcelino AP. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. Pesq. vet. bras., n. 32(7), p. 633-639, 2012.
11. MilkPoint. Produção de leite no Brasil deve ser de 37 milhões de litros em 2014. 26/12/2013. Disponível em: URL: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/producao-de-leite-no-brasil-deve-ser-de-37-bilhoes-de>

- litros-em-2014-86951n.aspx.
- 12.MilkPoint. Brasil deve subir no ranking mundial de produção de leite em 2014. 17/07/2014. Disponível em: URL: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/brasil-deve-subir-no-ranking-mundial-de-producao-de-leite-em-2014-90070n.aspx>.
 - 13.Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da produção pecuária. Setembro, 2014 Disponível em: URL: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201402_publ_completa.pdf.
 - 14.Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Perspectivas para agropecuária. V. 2, safra 2014/2015. Brasília: 2014.
 - 15.MilkPoint. IBGE: Produção de leite cresce 8,4% no 2º trimestre de 2014. 18/09/2014. Disponível em: URL: <http://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/ibge-producao-de-leite-cresce-84-no-2-trimestre-de-2014-91186n.aspx#>.
 - 16.Embrapa Gado de Leite. Plano pecuário nacional 2012/2013. Brasília: 02/02/2012. Disponível em URL: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Leite_e_derivados/30RO/App_PPN_Leite.pdf.
 - 17.Fagan EP. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química, microbiológica e toxicológica do leite produzido em duas granjas produtoras de leite tipo “A” no estado do Paraná. Dissertação. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006.
 - 18.Zanette E, Scapin D, Rossi EM. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. N. 1(1), p. 65-70. Unoesc & Ciência, ACBS, 2010.
 - 19.Oliveira CMC, Souza MG, Silva NS, Mendonça CL, Silveira JAS, Oiagen RP, Andrade SJT, Barbosa JD. 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, 2011.
 - 20.Costa EO, Santos FGB, Mármore C, Arcaro J, Peres AAC, Raia R. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismos do gênero *Staphylococcus* estimada pelo escore de CMT, CCS e na composição do leite: gordura, proteína e lactose. Napgama: n. 9, p.8-13, 2006.
 - 21.Santos MV, Fonseca LFL. Qualidade do leite e controle de mastite. Lemos editorial: 2000.
 - 22.Andrade UVC. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. Tese de Doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.
 - 23.Fontana VLDS, Giannini MJSM, Leite CQF, Miranda ET, Almeida AMF, Fontana CAP, Souza CM, Stella AE. Etiologia

- da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da B-Lactamase em *Staphylococcus aureus*. N. 17(4), p. 552-559. Veterinária e Zootecnia, 2010.
24. Langoni H, Penachio DS, Citadella JCC, Laurino F, Faccioli-Martins PY, Lucheis SB, Menozzi BD, Da Silva AV. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. V. 13, n. 12. Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira, 2011.
 25. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. Revista brasileira de medicina veterinária, n. 20, p. 204–209, 1998.
 26. Pinheiro de Sá ME, Cunha MLRS, Elias AO, Cassiano V, Langoni H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. Brazilian journal of veterinary research in animal science, n.41, p. 320 - 326, 2004.
 27. Philpot WN, Nickerson SC. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros, 1991.
 28. Beloti V, Müller EE, De Freitas JC, Mettifogo E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. N. 18(1), p. 45-53. Semina: Ciências Agrárias, 1997.
 29. Rosemberger G. Exame Clínico dos Bovinos. p. 306 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1993.
 30. Oliveira AJ, Moraes JF, Ferreira IC, Monteiro CP, Carvalho ADF. Mastite clínica e subclínica em pequenas propriedades leiteiras no município de Araguari – MG. N. 19 (1), p. 7-13. Uberlândia: 2013.
 31. Brito JRF, Caldeira GAV, Verneque RS, Brito MAVP. Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. vol.17, n.2. Pesq. Vet. Bras., 1997.
 32. Cunha RPL et al. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. vol.60, n.1, p. 19-24. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2008.
 33. Samford TLM, Da Silva CGM; Mota RA, Cunha Neto A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. V. 26, n. 1, p. 41-45. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006. Disponível em: URL: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100007>.
 34. Gomes MJP. Gênero *Staphylococcus* spp. Disponível em: URL: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>.

35. Koneman EW, Allen SD, Janda WD, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
36. Kloss WE, Lambe JR. *Staphylococcus*. In: Balows A. Manual of clinical microbiology. 5ª edição. Washington: American Society for Microbiology, 1991.
37. Mamizuka EM, Pignatari AC. *Staphylococcus*. Disponível em: URL:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3983d6804745833f8e7dde3fbc4c6735/staphylococcus_antonio_carlos_pignatari.ppt?MOD=AJPERES.
38. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. V. 121, p. 66-73. International journal of food microbiology, 2008.
39. Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino SI. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. v. 71, n. 5, p. 2793-2795. Applied and Environmental Microbiology, 2005.
40. Jorgensen HJ, Mathisen T, Lovseth A, Omoe K, Qvale KS, Loncarevic S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. P. 267-272. FEMS Microbiology Letters, 2005.
41. Novak FR. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.
42. Brito MAVP, Campos GMM, Brito JRF. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positiva isolados de mastite bovina. Ciência Rural, v.32, n.1, p.79-82, 2002.
43. Bastos CP. Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
44. Versalovick J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Methods in Molecular and Cellular Biology. V. 5, p. 25-40, 1994.
45. Werb E. O futuro está nos genes. P. 4-7. Porto Alegre: Revista Zero Hora, 17 de outubro 1999.
46. Vieira-da-Motta, Folly MM, Sakyama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. Brazilian journal of microbiology, v. 32, p. 27-31. São Paulo: 2001.
47. Roche Portugal. Introdução à PCR. Disponível em: URL:
<http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr/>.
48. Goh S, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene

- polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 30, p. 1642 – 1645, 1992.
49. Rodrigues S, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southern Brazil. *Canadian journal veterinary research*, n. 69, p. 260 – 264, 2005.
 50. Sanofi Pasteur MD. História das vacinas. Disponível em: URL: <http://www.vacinas.com.pt/vacinas/historia-das-vacinas>.
 51. Santos MV, Tomazi T. Vacinas e vacinações: uso de vacinas como ferramenta para controle da mastite bovina. *Abr.*, n.38, p. 20-27. Belo Horizonte: Leite integral, 2012.
 52. Silva N. Doença da glândula mamária: mamite/mastite. In: Marques DC. Criação de bovinos. 7 ed., p. 435 - 451. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003.
 53. Pankey JW, Duard G, Murray G, Twomey A. Evaluation of commercial bacterin against *Staphylococcus aureus* mastitis in New Zeland. p. 157-161. Dairy Research Report, Louisiana Agricultural Experimental Station, 1983.
 54. Pankey JW, Boddie NT, Watts JL, Nickerson SC. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. 68:726-731. *J. Dairy Sci.*, 1985.
 55. Smith GW, Lyman RL, Anderson KL. Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intramammary *Staphylococcus aureus* infections in dairy cattle. *Journal of american veterinary medical association*, v. 1, n. 228(3), p. 422 – 425, 2006.
 56. Middleton JR, Luby CD, Adams DS. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Veterinary microbiology*, v.16, n. 134, p. 192-198. 2009.
 57. Carvalho SDFSM. Enquadramento regulamentar das vacinas autógenas de uso veterinário e caracterização da sua utilização em Portugal. Dissertação (Faculdade de Farmácia). Lisboa: Universidade de Lisboa; 2007.
 58. Silva LCD, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecil-amônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. *Brazilian journal of veterinary research in animal science*, n. 41(3), p. 201-206, 2004.
 59. MAPA. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 31, de 20 de Maio de 2003. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1923149203>.
 60. Hwang CY, Pak SI, HanHR. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of veterinary medical science*, n. 62(8), p. 875-880, 2000.