

VACINAÇÃO COM BACTERINA DE *Staphylococcus aureus* NO CONTROLE DA MASTITE EM VACAS EM LACTAÇÃO

Luiz Rômulo Alberton
Pedro Ribas Werner
Laudi da Cunha
José Francisco Warth
Ana Paula P. A. Faraco
Newton Pohl Ribas

ALBERTON¹, L.R.A.; WERNER², P.R.; CUNHA³, L.; WARTH⁴, J.F.; FARACO³, A.P.P.A.; RIBAS⁴, N.P. Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1), p: 31 - 40, 2001.

RESUMO: A eficiência da vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite foi avaliada durante dezesseis semanas, em quarenta e cinco vacas da raça Jersey em lactação, em um rebanho, na região metropolitana de Curitiba. A vacina foi elaborada a partir de cepas de *S. aureus* coagulase positiva isoladas de casos de mastite subclínica da mesma propriedade e que foram inativadas com formalina e adicionadas de hidróxido de alumínio a 2,50% como adjuvante. O rebanho foi dividido em três lotes de quinze animais, sendo o controle, sem nenhum tratamento; o semanal, onde os animais receberam 3,0 ml da vacina, semanalmente, por via subcutânea na região do linfonodo mamário; e o quinzenal, que recebeu o mesmo tratamento do grupo anterior, mas a cada quinze dias. Amostras de leite foram colhidas de todos animais a cada semana e submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS). Demonstrou-se que as percentagens de amostras de leite com CCS inferior a 3×10^5 cél./ml foram maiores no grupo semanal ($p \leq 0,05$) do que nos demais grupos. Em relação ao total de casos, o número de amostras positivas ao CMT foi 59,60% menor ($p \leq 0,05$) no grupo semanal (9,16%) do que no grupo controle (22,70%). Também, as percentagens de infecções moderadas a graves ao CMT foram menores ($p \leq 0,05$) no grupo semanal (35,98%) do que nos grupos quinzenal (57,43%) e controle (63,3%). Durante o experimento, em todos os grupos, os casos de mastites subclínicas foram mais frequentes do que as outras formas clínicas da doença, atingindo 81,46% do total de casos de mastites, sendo *S. aureus* o principal agente causador. No grupo semanal, a percentagem de mastites subclínicas causadas por *S. aureus* foi menor (25,00%) do que no grupo controle (32,25%) e no grupo quinzenal (43,75%). Concluiu-se que a vacinação com bacterina de *S. aureus*, tendo hidróxido de alumínio como adjuvante, quando aplicada subcutaneamente na região do linfonodo mamário, uma vez por semana durante o curso da lactação, é capaz de diminuir tanto a prevalência quanto a gravidade dos casos de mastite em vacas leiteiras.

PALAVRAS-CHAVE: mastite, *Staphylococcus aureus*, bacterina, vacinação, vacas

¹ Médico Veterinário, Mestre, Professor de Clínica Médica de Grandes Animais do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAR – Universidade Paranaense. Praça Mascarenhas de Moraes, s/n. 87502-210 – Umuarama – PR – Brasil.

² Médico Veterinário, Mestre, Doutor, Professor de Patologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAR – Universidade Paranaense. Praça Mascarenhas de Moraes, s/n. 87502-210 – Umuarama – PR – Brasil.

³ Médico Veterinário

⁴ Médico Veterinário, Mestre, Professor do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, campus Curitiba

VACCINATION WITH *Staphylococcus aureus* BACTERIN FOR MASTITIS CONTROL IN COWS

ALBERTON, L.R.A.; WERNER, P.R.; CUNHA, L.; WARTH, J.F.; FARACO, A.P.P.A.; RIBAS, N.P. Vaccination with *Staphylococcus aureus* bacterin for mastitis control in cows. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1), p: 31 - 40, 2001.

ABSTRACT: The efficiency of vaccination with *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of mastitis in cows was evaluated in forty-five lactating Jersey cows. The bacterin was made from strains of *S.aureus* coagulase-positive isolated from the same herd tested. The bacteria were inactivated with formalin and 2.5% aluminum hydroxide was added as adjuvant. The herd was divided in three groups of fifteen animals as follows: Group I (control), without any treatment; Group II (weekly group), where the animals received weekly injections of 3.0 ml of the vaccine subcutaneously in the region of the mammary lymph-node for sixteen weeks; and Group III (biweekly group), which received the bacterin in two-week intervals for sixteen weeks. Samples of milk were collected weekly and evaluated with the California Mastitis Test (CMT) and Somatic Cells Counts (SCC). Results demonstrated that the percentage of samples with SCC inferior to 3×10^5 cells/ml and 5×10^5 cells/ml was larger in the weekly group ($p \leq 0.05$) than in other groups. The percentage of positive samples to CMT was 59.60% smaller ($p \leq 0.05$) in the weekly group than in control (9.16% and 22.70%, respectively). The percentages of moderate to severe infections according to CMT were smaller ($p \leq 0.05$) in the weekly group (35.98%) than control (63.33%) and biweekly groups (57.43%). During the experiment, in all the groups, cases of subclinical mastitis were more frequent than other forms of the disease, reaching 81.46% of the total of cases, and *Staphylococcus aureus* was the most frequent bacteria isolated. The percentage of *S. aureus* subclinical mastitis cases was smaller in the weekly group (25.00%) than in control group (32.25%) and in the biweekly group (43.75%). It was concluded that bacterin made from *S. aureus* isolated from the same herd and containing aluminum hydroxide as adjuvant, when injected SQ repeatedly at one-week intervals in the mammary lymph-node region during the course of lactation, is capable to decrease both the prevalence and the severity of mastitis in lactating cows.

KEY WORDS: mastitis, *Staphylococcus aureus*, bacterin, vaccination, cow

VACUNACIÓN CON BACTERINA DE *Staphylococcus aureus* EN EL CONTROL DE LA MASTITIS BOVINA

ALBERTON, L.R.A.; WERNER, P.R.; CUNHA, L.; WARTH, J.F.; FARACO, A.P.P.A.; RIBAS, N.P. Vacunación con bacterina de *Staphylococcus aureus* en el control de la mastitis bovina. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1), p: 31 - 40, 2001.

RESUMEN: La eficacia de la vacunación usando bacterina de *Staphylococcus aureus* en el control de la mastitis bovina fue evaluada en cuarenta y cinco vacas de la raza Jersey en lactación, en un rebaño de la región metropolitana de la ciudad de Curitiba. La bacterina fue preparada con cepas del *S.aureus* coagulase positiva aisladas de los casos de mastitis subclínica de lo mismo rebaño y que fueron inactivadas con formalina y recibieron la adición de hidróxido de aluminio al 2,50% como adyuvante. El rebaño fue dividido en tres grupos de quince animales: el grupo control, sin tratamiento; el grupo semanal, donde los animales recibieron 3,0 ml de la bacterina semanalmente, inyectada por vía subcutánea en la región de lo linfonodo mamario durante dieciséis semanas; y lo quincenal, que recibió lo mismo tratamiento del grupo anterior, pero a cada quince días también durante dieciséis semanas. Muestras de leche fueron colectadas de todos los animales a cada semana, y sometidas a los siguientes testes: *California Mastitis Test* (CMT)

y Cuenta de Células Somáticas (CCS). Se demostró que los porcentajes de muestras de la leche con CCS abajo de 3×10^5 células/ml fueron mayores en lo grupo semanal ($p \leq 0,05$) do que los otros dos grupos. En relación a el total de casos, lo número de muestras positivas a el CMT fue 59,60% menor ($p \leq 0,05$) en el grupo semanal (9,16%), en relación a el grupo control (22,70%). Los porcentajes de infecciones moderadas a graves a el CMT también fueron menores ($p \leq 0,05$) en el grupo semanal (35,98%), en relación a los grupos quincenal (57,43%) y control (63,3%). Durante el experimento, en todos los grupos, los casos de mastitis subclínicas fueron mas frecuentes do que las otras formas clínicas de la enfermedad, alcanzando 81,46% del total de los casos de mastitis, sendo *S. aureus* el principal causador. En el grupo semanal, el porcentaje de mastitis subclínicas causadas por *S. aureus* fue menor (25,00%) do que en el grupo control (32,25%) y en el grupo quincenal (43,75%). Se concluyó que la vacuna con la bacterina del *S. aureus*, conteniendo hidróxido de aluminio como adyuvante, cuando aplicada por la vía subcutánea en la región del linfonodo mamario, una vez por semana durante el curso de la lactación, es capaz de disminuir tanto la prevalencia cuanto la gravedad de los casos de mastitis en vacas en lactación.

PALABRAS-CLAVE: mastitis, *Staphylococcus aureus*, bacterina, vacunación, vaca

Introdução

Em todo o mundo, estudos recentes mostram a importância do *Staphylococcus* sp na mastite bovina, como demonstraram SEDDEK (1997), no Egito, onde o *Staphylococcus aureus* é responsável por 32,78% das mastites bacterianas; e SWAMI (1998), na Índia, que constatou que 54,05% das mastites subclínicas são causadas pelo *Staphylococcus epidermitis* e 44,50% pelo *Staphylococcus aureus*. Da mesma maneira, LOGUE (1997) demonstrou que, na Escócia, o *Staphylococcus aureus* é o agente causal mais prevalente e mais difícil de controlar, sendo responsável pelas altas contagens de células somáticas e por casos de mastite subclínica. Além disso, a importância do patógeno como causador de mastites aumentou nos últimos anos, como demonstrou ZECONNI (1998), em rebanhos italianos, onde houve aumento da porcentagem de infecções causadas por *S. aureus* de 10% em 1973 para 35% em 1996. Ainda MIHAIU (1996), estudando a flora microbiana de amostras de leite de vacas com mastites subclínicas, isolou *Staphylococcus* sp em 62,70% das amostras, sendo 45,00% do tipo coagulase positiva e 17,70% coagulase negativa.

No Brasil, VIANNI (1992) isolou *S. aureus* coagulase positiva de 52,22% e *S. aureus* coagulase negativa de 16,67% das amostras em estudo realizado em Itaguai - Rio de Janeiro. Da mesma maneira, COSTA (1995), em São Paulo e Minas Gerais, constatou que 34,00% das mastites em 3.574 vacas eram devido ao *Staphylococcus* sp e 21,77% ao *Streptococcus* sp.

Quando o *S. aureus* progride, através dos ductos da glândula mamária, as toxinas causam injúrias ao epitélio ductal que resultam em liberação de substâncias quimiotáticas, atraindo leucócitos. As toxinas causam também liberação de lisossomos leucocitários, aumentando a injúria ao epitélio mamário. Os fatores plasmáticos e células descamadas formam grumos que ocluem os ductos e impedem a drenagem dos lóbulos, induzindo retenção de leite e involução do alvéolo comprometido. A persistência do *S. aureus* viável no foco inflamatório provoca destruição do ducto e expansão da reação inflamatória com formação de microabscessos. O epitélio do ducto, constituído normalmente de uma camada de células cubóides, sofre metaplasia pavimentosa e torna-se estratificado. Posteriormente, o estroma mamário é infiltrado por linfócitos e células plasmáticas, caracterizando um processo crônico. Como o *S. aureus* difunde-se para novas áreas da glândula, focos adicionais de mastite se desenvolvem. Deste modo, do ponto de vista patológico, focos de inflamação aguda e crônica podem coexistir. Leucócitos fagocitam os *S. aureus*, mas substâncias produzidas por estes os protegem das enzimas digestivas daqueles e sua sobrevivência pode representar a morte do leucócito. O rápido crescimento bacteriano, com produção de grandes quantidades de alfa-toxinas pode resultar em constricção alveolar com isquemia e desenvolvimento de gangrena (SCHALM, 1971).

Segundo OWENS (1997), a recuperação de infecções *S. aureus* é de 70,00%, enquanto a taxa de cura para infecções antigas é muito baixa, menor que 35,00%, ressaltando a natureza quase intratável da infecção crônica.

Segundo SORDILLO (1997), a imunidade da glândula mamária é representada pela barreira física do esfíncter da teta, pela queratina do canal da teta e pela presença de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e fatores solúveis como a lactoferrina, moléculas do sistema complemento, lisozima, sistema peróxido de hidrogênio-tiocianato-peroxidase, citocinas e anticorpos (IgG1, IgG2, IgA e IgM) no leite. Ácidos graxos como o mirístico, palmitoléico e linoléico associados à queratina têm função bacteriostática.

No pico de lactação, a grande quantidade de leite produzida dilui os fatores de proteção da glândula mamária, em especial lactoferrinas, leucócitos polimorfonucleares, anticorpos e lactoperoxidases (SANDHOLM & KORHONEN, 1995). Além disso, algumas cepas bacterianas, como do *S. aureus*, formam em torno de si uma cápsula viscosa de polissacarídeos como proteção e usam proteínas do hospedeiro como caseína, fibrinogênio e imunoglobulinas, para proteger-se do sistema imune. Algumas cepas de *S. aureus* podem aderir-se aos tecidos protegendo-se do fluxo de saída do leite durante as ordenhas (SANDHOLM *et al.* 1990).

A proteína A, que é um componente da parede celular do *S. aureus*, pode bloquear o processo de opsonização quando se liga à porção Fc da imunoglobulina dificultando a fagocitose. Muitos estafilococos apresentam pseudocápsulas de polissacarídeos que impedem a formação de anticorpos protetores. A formação destes anticorpos só é observada quando ocorre conjugação destes polissacarídeos a proteínas carreadoras (FRIEDRICH, 1998).

Segundo PHILPOT (1998), a contagem de células somáticas (CCS) é uma técnica importante para a monitorização do *status* inflamatório das glândulas mamárias em produção. Outros estudos têm demonstrado que durante a inflamação, o aumento no número de células somáticas é devido ao fluxo de neutrófilos para a glândula mamária a fim de combater a infecção (HARMON & HEALD, 1982; MILLER & PAAPE, 1985; HARMON, 1994).

Vários métodos são utilizados para contar ou estimar o número de células somáticas no leite e, conseqüentemente para o diagnóstico da mastite, dentre eles citam-se a Contagem Microscópica Direta (CMD), a Contagem Eletrônica de Células (CEC), o *California Mastitis Test* (CMT) e o *Wis-*

consin Mastitis Test (WMT). Entretanto, a campo, tem-se utilizado o CMT por ser um método prático e de eficácia comprovada para diagnóstico da inflamação das mamas em vacas em lactação (SILVA, 1999).

RENEAU (1986) afirma que vacas não infectadas deveriam ter CCS inferior a 3×10^5 céls/ml aos cinco dias após o parto e PHILPOT (1998) afirma que vacas com úberes saudáveis apresentam CCS no leite inferior a 3×10^5 células por mililitro de leite.

O uso de antimicrobianos no controle da mastite não tem oferecido bons resultados. A resistência dos patógenos a estes produtos tem sido verificada por alguns pesquisadores. Também os resíduos destas drogas no leite têm limitado o tratamento de vacas lactantes com mastite.

LANGONI (1999), estudando a sensibilidade aos antibióticos de cepas de *S. aureus* presentes no leite, no estado de São Paulo, encontrou grande incidência de resistência aos principais antimicrobianos. Também DONATELE (1999) demonstrou, em estudo de sensibilidade de *S. aureus* coagulase positiva no Estado do Rio de Janeiro, que 91,70% das cepas eram resistentes à penicilina, 64,50% à oxacilina, 89,50% à ampicilina e 82,80% à amoxicilina.

A vacinação tem por objetivo aumentar as concentrações de anticorpos no sangue e no leite frente o organismo específico, deste modo fornecendo imunidade pela inibição do crescimento bacteriano e da produção de toxinas. Pelo fato do *S. aureus* responder tão pouco à terapia com antibióticos, vacinas contra estes microorganismos têm sido mais estudadas (NICKERSON, 1998).

Muitos estudos iniciais utilizaram injeções de bacterinas derivadas de cultura *in vitro*. Embora os títulos de anticorpos séricos aumentassem após a imunização, concentrações adequadas de anticorpos no leite somente são observadas após a inflamação, pela presença dos microorganismos. Títulos elevados de anticorpos do leite diminuem a severidade da doença, mas não têm efeito na prevenção de nova infecção mamária (BROCK, 1975).

YOSHIDA *et al.* (1984) formularam uma vacina com *Staphylococcus* encapsulado, consistindo de *S. aureus* tipo A e B inativados pelo calor, além de polissacarídeos capsulares extraídos de *S. epidermidis*. Esta preparação foi aplicada em dois rebanhos pela via intramuscular seguida de refor-

ço 15 dias após. Nos quatro meses seguintes, a taxa de mastite por *S. aureus*, bem como a CCS foram menores nas vacas vacinadas do que no grupo controle.

WATSON *et al.* (1996) desenvolveram um toxóide celular inativado, preparado de duas cepas de *Staphylococcus aureus* que produziram material pseudocapsular e hemolisinas beta e gama, e que depois foram misturados com um adjuvante de óleo mineral e Dextran sulfato. Após aplicação por via intramuscular por duas vezes, em intervalos de 4 a 6 semanas durante as últimas 10 semanas de prenhez, o número de casos clínicos de mastite foram menores nas vacas vacinadas do que no grupo controle, embora a diferença não tenha sido significativa.

GIRAUDO *et al.* (1997) desenvolveram uma vacina baseada em *S. aureus* inativados e encapsulados, extrato bruto de exopolissacarídeos de *S. aureus*, e espécies de *S. aureus* e *Streptococcus sp* não-encapsulados inativados, em adjuvante de hidróxido de alumínio. As frequências de mastites foram reduzidas de 18% no grupo controle para 6,7 e 6,0% nas novilhas vacinadas pré-parto e pós-parto, respectivamente, e este efeito foi mantido por no mínimo 6 meses. A produção de gordura aumentou levemente no leite das vacas vacinadas, mas não houve efeitos na CCS quando comparada com a do grupo controle.

Segundo TIZARD (1998), quando o antígeno entra nos linfonodos, inicia-se a captura linfocítica, ou seja, os linfócitos que de forma normal passam livremente através desses órgãos são capturados de forma a não poderem sair. O mecanismo do processo de captura não é claro, mas provavelmente resulta da interação entre antígeno e macrófagos, levando à liberação de um fator que ativa linfócitos. A captura concentra linfócitos próximo aos locais de acúmulo antigênicos, o que aumenta a eficiência da resposta imune. Alguns adjuvantes também podem agir por meio da potencialização da captura. Após cerca de 24 horas, o linfonodo libera células capturadas e aumenta sua produção de células de defesa durante aproximadamente sete dias.

Uma injeção intramuscular de bacterina no fim da lactação, seguida de uma injeção de reforço na área do linfonodo mamário no período pré-parto, resulta em altos títulos de anticorpos durante a lactação subsequente e promove a proliferação de células linfóides sensibilizadas no tecido mamário involuído, produzindo grandes quantidades de IgA e IgM

(NICKERSON, 1998).

A eficácia de uma vacina pode ser medida pela porcentagem de animais que respondem satisfatoriamente ao desafio. A eficácia real de uma vacina, chamada de fração evitável (FE) é calculada pela seguinte fórmula:

$$FE = \frac{\% MC - \% MV}{\% MC}$$

onde:

% MC= % de morte de controles

% MV= % de morte de vacinados

As vacinas boas e efetivas devem ter uma FE de pelo menos 80%. Contudo, vacinas menos efetivas tornam-se aceitáveis se não houver nenhuma melhor (TIZARD, 1998).

Não se conseguiu encontrar referências na literatura quanto ao emprego de vacina (bacterina) contra *S. aureus* injetada na região do linfonodo mamário, em intervalos de uma ou duas semanas, durante quatro meses em vacas lactantes. Assim, conduziu-se o presente experimento, cujo principal objetivo foi avaliar a eficácia dessa nova alternativa terapêutica.

Material e Métodos

Animais e manejo do rebanho

Foram utilizadas vacas lactantes da raça Jersey, de alto padrão zootécnico, em uma propriedade da região metropolitana de Curitiba¹. A composição da dieta varia conforme a produção e as vacas são separadas em quatro lotes, segundo a produção e sanidade da glândula mamária, sendo que as vacas com mastite subclínica, crônica ou que estejam em tratamento permanecem no último lote a ser ordenhado para evitar que o leite com resíduos e patógenos se misture no tanque de coleta.

A ordenha é feita mecanicamente duas vezes ao dia. A sala de ordenha está instalada em forma de espinha de peixe e tem capacidade para ordenhar seis vacas por vez. A cada ordenha, todas as vacas são submetidas ao teste do caneco do fundo escuro para detectar possíveis mastites clínicas. Antes da ordenha, as tetas são submergidas em uma solução desinfetante à base ácido cloroso e dióxido de cloro. Caso as tetas estejam sujas, elas são lavadas com água antes desse procedimento. A se-

guir, as tetas são limpas e secas com toalha de papel, usando-se uma toalha para cada teta. Após a ordenha, aplica-se o mesmo produto usado antes da ordenha.

Semanalmente, as vacas são submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT), sendo que a partir desse teste a inflamação da mama é classificada em leve (traço e positiva +), moderada (positiva ++) e grave (positiva +++).

Isolamento do patógeno

Amostras de leite foram colhidas assepticamente em frasco estéril das vacas que apresentavam mastite subclínica detectadas pelo método do CMT e CCS. As amostras foram enviadas sob refrigeração para o laboratório² para isolamento do agente etiológico da mastite. No laboratório, as amostras de leite foram semeadas em ágar manitol e ágar sangue e as placas incubadas a 37°C durante 48 a 72 horas.

A análise do crescimento bacteriano, em ambos os meios de cultivo foi realizada conjuntamente. As colônias brancas ou amareladas, com ou sem hemólise em ágar sangue e apresentando diâmetro maior que 1mm foram coradas pela técnica de Gram e submetidas ao teste de coagulase em lâmina. Cocos Gram-positivos e coagulase positivos foram considerados como sendo *S. aureus*. Concomitantemente, no ágar manitol, colônias amarelo douradas, manitol positivas foram consideradas suspeitas. Estas foram semeadas em ágar sangue e submetidas aos mesmos procedimentos citados anteriormente.

As cepas isoladas de, no mínimo, 10 animais da mesma propriedade foram utilizadas para a confecção da vacina.

Elaboração da vacina

As cepas de *S. aureus* coagulase positiva utilizadas como antígeno vacinal foram submetidas aos testes de sensibilidade e resistência aos principais antimicrobianos, para determinar sua pureza, sendo utilizadas as cepas que apresentaram comportamento idêntico.

A cepa de *S. aureus* coagulase positiva isolada foi cultivada em 250 ml de caldo BHI com 1% de glicose, em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 1.000 ml e incubado em estufa a 37°C

durante 5 dias sob agitação contínua.

Após este período, o cultivo foi submetido a dois teste de pureza, semeando-se em ágar sangue de carneiro e ágar manitol, que foram incubados a 37 °C por 48 horas. Para os procedimentos de contagens do número de bactérias (determinação do número de unidades formadoras de colônia - UFC), utilizou-se a técnica de diluição decimal até 10⁻¹⁰ em solução fisiológica até obter-se 17 x 10⁹ UFC/ml em placa para contagem em ágar.

A inativação das bactérias foi feita adicionando-se formalina ao caldo para atingir a concentração de 6/1000. A seguir, o caldo bacteriano foi incubado a 37°C por 48 horas, após as quais foi realizado o teste de esterilidade. Este consistiu na colheita de 10 ml da suspensão, que foram semeados em Thioglicolato e caldo Sabouraud e incubados a 37°C durante 48 a 72 horas e a 21°C durante 15 dias, respectivamente. Uma vez constatada a esterilidade, adicionaram-se ao caldo 25 ml de solução de hidróxido de alumínio a 10% como adjuvante vacinal, atingindo a concentração final de 2,5% na vacina. Testes de inocuidade foram realizados inoculando-se 1ml da bacterina em duas cobaias (*Cavia porcellus*) pela via subcutânea. Comprovada sua inocuidade, a bacterina foi envasada em frascos contendo 50 ml e mantida refrigerada em geladeira a 2 - 8°C.

Delineamento experimental

Foram utilizadas 45 vacas em lactação escolhidas de forma aleatória e divididas em três grupos de 15 vacas cada. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento; o grupo semanal era vacinado semanalmente, cada vaca recebendo 3,0 ml da bacterina por via subcutânea na região adjacente ao linfonodo mamário e o grupo quinzenal era vacinado a cada quinze dias da mesma maneira que o grupo semanal. O experimento teve duração de quatro meses, o grupo semanal recebendo um total de 16 doses de vacina e o grupo quinzenal, oito doses de vacina. As vacas eram vacinadas após a ordenha, enquanto se alimentavam no *free-stall*. Amostras de leite eram colhidas semanalmente de todas as vacas dos três grupos. O leite era colhido, diretamente do balão na sala de ordenha, em frascos especiais fornecidos pelo laboratório da APCBRH com capacidade para 30 ml e contendo uma pastilha de dicromato de potássio como con-

servante. As amostras eram datadas, identificadas e enviadas ao laboratório a temperatura ambiente para contagem de células somáticas (CCS). A contagem de células somáticas foi feita com equipamento automático³, no laboratório da APCBR. A CCS foi estudada em nível de 3×10^5 céls/ml que foi utilizado como limite entre a mama sadia e a infectada.

As vacas que apresentavam mastite clínica ou contagem de células somáticas acima de 5×10^5 céls/ml de leite, foram submetidas a exames bacteriológicos para identificar o patógeno.

Análise estatística

As variáveis foram analisadas por meio do teste do Qui-quadrado.

Nesta análise não foram levadas em conta as formas mais brandas de mastite, possíveis diferenças na qualidade do leite, bem como as despesas com mão-de-obra e prejuízos com descarte de animais.

Cálculo da eficácia da vacina

O cálculo foi feito através da fórmula proposta por TIZARD, 1998, cujo resultado é uma estimativa da fração evitável da vacina. Para tanto, substituiu-se a porcentagem de mortes pela porcentagem de mamas afetadas.

$$FE = \frac{\% \text{ MAGC} - \% \text{ MAGS}}{\% \text{ MAGC}}$$

onde:

% MAGC = % de mamas afetadas grupo de con-

trole

% MAGS = % de mamas afetadas grupo semanal

Resultados

Reação à aplicação da vacina

Em nenhum dos animais foram observadas reações locais ou sistêmicas, atribuíveis à presença da vacina no tecido subcutâneo próximo à região do linfonodo mamário, a não ser discreto e passageiro aumento de volume no local da aplicação, que foi atribuído ao trauma próprio da administração da vacina. A posição dos animais no *free stall* facilitou grandemente o procedimento, tanto para a aplicação como a avaliação de eventuais reações.

Prevalência da mastite durante o experimento

Durante 16 semanas de experimento, nas 45 vacas ocorreram 27 casos de mastite, sendo que 22 casos (81,48%) foram de mastites subclínicas e cinco casos (18,54%) de mastite clínica.

Quanto à mastite subclínica, 16 casos (72,72%) foram causados por *S. aureus* coagulase positiva, três (13,60%) por *S. aureus* coagulase negativa, e em três (13,60%) das amostras não se conseguiu isolar o patógeno. As mastites subclínicas causadas por *S. aureus* coagulase positiva ocorreram nos três grupos, distribuídos da seguinte forma: 32,25% no grupo controle; 25,00% no grupo semanal; e 43,75% no grupo quinzenal.

Análise da contagem de células somáticas/ml de leite

Tabela 1 - Número de amostras de leite com contagem de células somáticas superior e inferior a 3×10^5 Céls/ml em vacas vacinadas contra mastite com bacterina des. *aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas

GRUPO	ACIMA DE 3×10^5 céls/ml		ABAIXO DE 3×10^5 céls/ml		TOTAL
	n	%	n	%	n
Controle	80	38,27 ^b	129	61,72	209
Semanal	46	18,77 ^a	199	81,22	245
Quinzenal	59	29,20 ^b	143	70,80	202
Total	185	28,20	471	71,80	656

Nota: a é diferente de b ($p \leq 0,05$).

Os resultados provenientes das provas do CMT estão agrupados nas tabelas 2 a 4, sendo que a distribuição de mastite, segundo sua gravidade entre os grupos, estão representados graficamente na figura 1.

Tabela 2 - Número de mamas afetadas com mastite, ao teste do CMT em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas

GRUPO	MAMAS AFETADAS		MAMAS NÃO AFETADAS		TOTAL
	N	%	n	%	n
Controle	87	22,70 ^b	637	77,3	824
Semanal	83	9,16 ^a	823	90,83	906
Quinzenal	174	24,85 ^b	526	75,14	700
Total	444	18,27	1986	81,73	2430

CMT- *California Mastitis Test*Nota: a é diferente b ($p \leq 0,05$).Tabela 3 - Número de mamas afetadas, segundo a severidade da reação pelo CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas

GRUPO	Traço		+		++		+++		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
Controle	108	13,1	195	23,6	179	21,7	342	41,5 ^c	824	100
Semana	304	33,5	276	30,4	145	16,0	181	19,9 ^a	906	100
Quinzenal	97	13,8	201	28,7	133	19,0	269	38,4 ^b	700	100

Nota: a, b, c são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).CMT: *California Mastitis Test*

Traço: suspeito; +, ++ e +++ resultados positivos em ordem de severidade da reação ao CMT

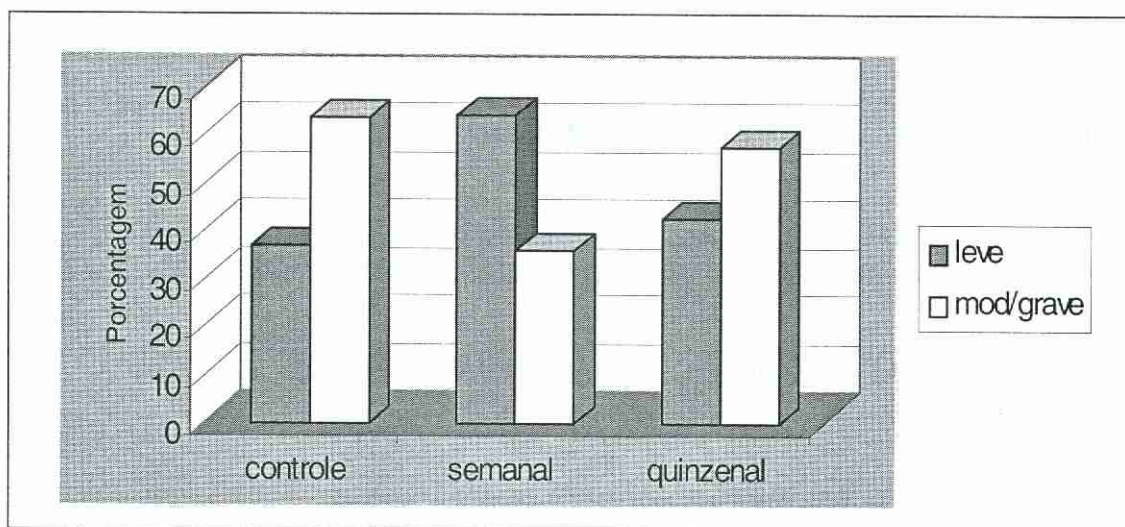
Tabela 4 - Gravidade da infecção mamária, de acordo com o CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas

GRUPO	LEVE		MODERADA A GRAVE		TOTAL	
	N	%	n	%	N	%
Controle	303	36,7	521	63,3 ^c	824	100
Semanal	580	64,1	326	35,9 ^a	906	100
Quinzenal	298	42,6	402	57,4 ^b	700	100

Nota: a, b, c são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).CMT: *California Mastitis Test*

Leve: reações suspeitas e positivas + ao CMT

Moderada a grave: reações positivas ++ e +++ ao CMT

Figura 1 - Distribuição dos casos de mastite quanto à gravidade da lesão, segundo reação ao CMT (*California Mastitis Test*), em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas

Cálculo da eficácia da vacina

Por meio da fórmula de fração evitável da vacina (FE), o resultado para o grupo semanal foi de 59,60%, no entanto para o grupo quinzenal não foi possível determinar porque não houve diferenças entre este grupo e o controle.

Discussão e Conclusões

Na análise da contagem de células somáticas, verificou-se que no grupo semanal, a percentagem de amostras com CCS inferior a $3,0 \times 10^5$ céls/ml, foi maior em 31,60% em relação ao grupo controle. Considerando que no leite de glândulas saudáveis a CCS deve ser inferior a $3,0 \times 10^5$ céls/ml (RENEAU, 1986) e que contagens acima desse valor indicam inflamação da mama (PHILPOT, 1998), pode-se dizer que a bacterina aplicada semanalmente diminui a percentagem de vacas portadoras da doença. A metafilaxia provavelmente tenha estimulado o suficiente a produção de anticorpos para, conseqüentemente, diminuir a extensão da injúria ao epitélio mamário causado pelo *S. aureus* e diminuir a atração de células de defesa para o foco da inflamação.

Encontrou-se percentagem menor de mamas afetadas nas vacas vacinadas semanalmente do que no grupo controle (9,16% e 22,70%, respectivamente), o que representa uma diminuição de 59,60% na percentagem de mamas afetadas. Além disto, as percentagens de mamas afetadas ao CMT, classificadas como moderadas e grave, foram significativamente menores no grupo semanal, comparando-se com o grupo controle e quinzenal (35,98%, 63,22% e 57,43%, respectivamente). A estimulação semanal foi eficaz na redução do número de casos de mastite e na gravidade das infecções. Para que isso tenha ocorrido, era necessário que já houvesse grande quantidade de imunoglobulinas e células de defesa disponíveis e capazes de proteger a glândula em tempo hábil quando infectada, já que o *S. aureus*, apesar de ter alta patogenicidade, tem baixo poder imunogênico (FRIEDRICH, 1998) e o leite dilui grande parte dos fatores de defesa da glândula (SANDHOLM & KORHONEN, 1995). A aplicação da vacina repetidamente e a intervalos relativamente curtos foi, aparentemente, o fator capaz de manter os níveis de imunoglobulinas, células e outros fatores num patamar adequado para enfrentar o desafio representado pelo *Staphylococcus aureus*.

A fração evitável da vacina foi de 59,60%. Mas segundo TIZARD (1998), as boas vacinas devem ter uma fração evitável de pelo menos 80,00%. Considerando o certo insucesso das vacinas contra mastite estafilocócica, uma fração evitável de aproximadamente 60% de mamas com mastite parece ser um resultado bastante animador.

Durante as dezesseis semanas de experimento, as mastites subclínicas foram as mais freqüentes

(81,46% do total de casos de mastite), sendo o *S. aureus* o principal agente causador. Embora tenham ocorrido em todos os grupos, no grupo semanal a percentagem de mastites subclínicas causada por *Staphylococcus aureus* foi menor, provando a eficiência desse esquema posológico. No grupo quinzenal foi onde ocorreu maior número de casos de mastite clínica (43,75% do total dos três grupos), sendo apenas dois casos por *S. aureus* e o restante causadas por coliformes. Em virtude do pequeno volume de dados da avaliação microbiológica, não foi possível fazer uma análise estatística para estabelecer diferenças significativas, mas os dados obtidos permitem dizer que, embora não tenha impedido que as glândulas fossem infectadas, a gravidade e a prevalência das infecções subclínicas causadas por *S. aureus* coagulase positiva foram menores nos animais onde a vacina foi repetida semanalmente. A diminuição da gravidade da infecção nas vacas vacinadas semanalmente tem um significado importante no que diz respeito ao dano que o *S. aureus* causa ao tecido secretor, que poderia comprometer seriamente a produção em lactações futuras (SCHALM, 1971).

É questionável a influência do local da aplicação das vacinas na resposta imunitária do paciente. Isto é, questiona-se se a aplicação da vacina nas proximidades da mama e do linfonodo mamário induziriam melhores respostas do que a aplicação no tecido subcutâneo de qualquer outra região corporal. NICKERSON (1998) e TIZARD (1998) afirmaram que a deposição de antígeno naquela região resultaria em uma maior proliferação de células de defesa e maior produção de imunoglobulinas, mas tal afirmação não pode ser confirmada no presente experimento por não ter sido este o seu objetivo. Assim, recomenda-se que novas pesquisas sejam feitas para comprovar aquela hipótese. Contudo, pode-se afirmar que aquele local de aplicação é conveniente devido à posição dos animais no estábulo. Isto, aliado à ausência de reações adversas recomendam local e a via de aplicação como ideais para vacinação das vacas contra mastite.

Levando em conta estes resultados, podemos afirmar que a prática da metafilaxia com bacterina de *S. aureus* aplicada semanalmente na região do linfonodo mamário pode ser adotado temporariamente como uma das medidas de controle da mastite estafilocócica, juntamente com a terapia da vaca seca, descarte de animais cronicamente afetados, higiene e regulagem adequada no equipamento de ordenha. A duração do tratamento pode variar de rebanho para rebanho, até que se consiga controlar as infecções intramamárias pelo *S. aureus* no rebanho.

Com base nos dados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* isolados do próprio rebanho foi eficaz no controle de mastite contagiosa em vacas lactantes, sendo que a vacinação semanal apresentou melhores resultados do que a vacinação quinze-

nal.

2. A prevalência de mastites subclínicas, bem como a gravidade das mesmas infecções diminuíram com a aplicação semanal.
3. Apesar de diminuir significativamente o número de casos de mastites, a vacinação semanal não foi capaz de impedir totalmente a ocorrência da doença no rebanho, comprovando que apenas a vacinação não substitui as boas práticas de manejo.
4. A vacinação pode ser empregada semanalmente para ajudar a controlar as mastites em rebanhos, onde a prevalência do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva for importante, sendo que o tempo de tratamento pode variar de acordo com cada rebanho.
5. A aplicação subcutânea da vacina na região do linfonodo mamário é fácil de ser executada devido a posição dos animais no *free stall*. Isto, aliado à ausência de reações locais, pode ser recomendada como prática de rotina para administração de vacina anti-mastite.

Referências

BROCK, J. H.; STEEL, E.D. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infections by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.*, 19:152. 1975.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A. *et al.* Estudo etiológico da mastite bovina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, p.156-8. 1995.

DONATELE, D.M.; FOLLY, M.M.; MOTTA, O.V.; TEIXEIRA, G.N. Identificação e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva no gado de leite das regiões Norte/Noroeste de Estado do Rio de Janeiro. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999. 185 p.156.

FRIEDRICH, A.; CHEMELLO, D.; RIBEIRO, S.P.; SCROFERNEKER, M.L. Imunidade a bactérias. In: SCROFERNEKER, M.L. *Imunologia Básica Aplicada*. 1998. p.327-335.

GIRAUDO, J. A.; CALZOLARI, H. RAMPONE *et al.* Field trials of vaccine against bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 80:845-853. 1998.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 77:2103. 1994.

HARMON, R.J. and C.W. HEALD. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 43:992. 1982.

LANGONI, H.; KUNG, D.C.; DA SILVA, A.V.; DOMINGUES, P.F. Etiologia e sensibilidade a antibacterianos na mastite bovina. In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999. 185 p.154 p.

LOGUE, D.N. Mastitis organisms and high somatic counts. *Cattle Practice*, 5:2, p.67-77. 1997.

MIHAIU, M. *et al.* Studies on the correlation between milk somatic cell count and microbial flora. *Bulletinul Univ. Stiinte Agricole Napoca; seria Zootehnie si Med. Veterinara*. 50:89-92. 1996.

MILLER, R.H. and M.J. PAAPE. Relationship between milk somatic cell count and milk yield. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc.*, p.60. 1985.

NICKERSON, S.C. O papel das vacinas no controle da mastite. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE. (1:1998, Curitiba). *Anais...* Curitiba. 1998. 88 p.44-53 p.

OWENS, W.E. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 80:2, p.313-317. 1997.

PHILPOT, W.N. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE. (1:1998, Curitiba). *Anais...* Curitiba. 1998. 88 p.28-35 p.

RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.* 69:1708. 1986.

SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v. 13, 0.248-60, 1990.

SANDHOLM, M.; KORHONEN, H. Antibacterial defence mechanisms of the udder. In: SANDHOLM, M.; HONKANKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. *The bovine udder in mastitis*. Helsinki: University of Helsinki Faculty of Veterinary Medicine, 1995.

SCHALM, O.W. *Bovine Mastitis*. U.S.A, Philadelphia: Lea & Febiger, 1971

SEDDEK, S.R. Bovine Mastitis (age, causes and control) en assint governovate. *Assint Veterinary Medical Journal*, 36 71, 149-162. 1997.

SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Anais...* Botucatu. 1999. 185 p.51 - 55 p.

SORDILLO, L. M. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science* vol 80, 8, p 1851-1865. 1997.

SWAMI, M.C., KRISHNA MURTHY. Prevalence of *Staphylococcus* species in California Mastitis Test positive cows. *Indian Veterinary Journal*, 75:2, 101-103p. 1998.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária*. São Paulo: Roca, 1998. 545p.

VIANNI, M.C. 1992. Frequência de Isolamento de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea. *Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro*, 15(2): 187-192. 1992.

WATSON, D.L.; M.L. McCOLL, and H. I. DAVIES. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Aust. Vet. J.*, 74:448-450. 1996.

YOSHIDA, K.; Y. ICHIMAN, and S. NARIKAWA. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. *J. Dairy Sci.* 67:620-627. 1984.

ZECCONI, A. *Staphylococcus aureus* intramammary infections as a model to investigate the relationship between immunity and bacterium. *Microbiology Journal*, 7:1, 51-53. 1998.

Recebido para publicação em 21/05/00.
Received for publication on 21 May 2000.

Recibido para publicación en 21/05/00.

Aceito para publicação em 30/11/00.

Accepted for publication on 30 November 2000.

Acepto para publicación en 30/11/2000.