



**RAFAELLA SILVA ANDRADE**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIGÊNICA DE BACTERINA  
CONTRA *Streptococcus agalactiae***

**LAVRAS – MG  
2018**

**RAFAELLA SILVA ANDRADE**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIGÊNICA DE BACTERINA CONTRA**  
*Streptococcus agalactiae*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS – MG**  
**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Andrade, Rafaella Silva.

Produção e avaliação antigênica de bacterina contra  
*Streptococcus agalactiae* / Rafaella Silva Andrade. - 2018.  
47 p. : il.

Orientador(a): Geraldo Márcio da Costa.

Coorientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles, Ana Paula  
Peconick.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Vacina. 2. Mastite Bovina. 3. Resposta Imune. I. da Costa,  
Geraldo Márcio. II. Dorneles, Elaine Maria Seles. III. Peconick,  
Ana Paula. IV. Título.

**RAFAELLA SILVA ANDRADE**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIGÊNICA DE BACTERINA CONTRA  
*Streptococcus agalactiae***

**PRODUCTION AND ANTIGENIC EVALUATION OF BACTERINE AGAINST  
*Streptococcus agalactiae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de setembro de 2018.

Dr. Geraldo Márcio da Costa	UFLA
Dr <sup>a</sup> Ana Paula Peconick	UFLA
Dr <sup>a</sup> Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA
Dr <sup>a</sup> Glei dos Anjos de Carvalho Castro	UninCor

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2018**

## AGRADECIMENTOS

É com enorme satisfação e realização que termino esta grande etapa da minha formação acadêmica.

Este trabalho foi realizado com muita dedicação, esforço, determinação e com a consciência que dei o meu melhor, mas não o teria conseguido fazer sozinha. Por isso, deixo aqui os meus agradecimentos:

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por estarem presente em todos os momentos dos meus dias, da minha vida. Por toda a força a mim concedida, com a qual pude superar todos os desafios e obstáculos, vencer todos os desatinos, e manter-me sempre esperançosa para que este momento se tornasse realidade. Foi através da fé e dessa força vinda Deles que descobri que podemos conseguir tudo aquilo que sonhamos.

Aos meus pais, Luciano e Sônia, por serem os melhores pais do mundo, que são meus anjos da guarda, pessoas enviadas por Deus na minha vida, minha família mais do que abençoada, que são meus grandes espelhos de luta e dedicação. Pessoas a quem devo tudo, que sempre me amaram, me ajudaram e estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos da vida. Foram responsáveis por toda a minha educação, sempre me ensinando a ser uma pessoa que faz o bem;

Agradeço à minha querida irmã, Cacá, por sempre me transmitir coragem e esperança, por me escutar e sempre ter uma palavra amiga. Por todo apoio e por me fazer sentir tão amada, mesmo estando longe;

Ao meu avô, Vovô João, que hoje mora com Deus, dono da minha maior saudade, que sempre me apoiou e me fazia sentir a pessoa mais especial do mundo;

Às minhas avós, Vovó Maria e Vovó Gêsa, que são exemplos de mulheres guerreiras e generosas;

Ao meu companheiro de vida, Marco Túlio, meu melhor amigo, confidente, razão dos meus melhores sorrisos, por sempre estar presente, pelas palavras de coragem, pela inesgotável paciência, pelo amor incomparável, por apoiar meus sonhos e sonhá-los comigo. Obrigada por esse amor tão lindo e por acreditar e ver um potencial em mim, que me faz querer ser cada dia melhor!

Aos meus amigos de Bambuí e de Lavras, por todos os momentos divertidos e de descontração, todas as conversas, gargalhadas, desabafos, alegrias, apoio, partilhas, obrigado pela vossa amizade e por simplesmente estarem lá nos momentos preciosos e importantes;

Ao meu presente de Deus no mestrado, Dirce, minha amiga, confidente, que sempre se disponibilizou a me ajudar em qualquer questão ou problema e que sempre tinha uma palavra doce para me dar;

À Marina Martins, que se transformou em uma grande amiga, companheira de trabalhos, seminários e que, com esse jeitinho todo doce mas nada doce, cativa todos a sua volta;

As colegas do Laboratório de Microbiologia do DMV, que são pessoas que muito me ensinaram e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, em especial: Amanda, Cris, Estéffany, Maysa, Marina Romano e Núbia, pelas conversas, momentos de descontração, pela ajuda e companhia;

Aos funcionários do DMV, Érika (Biotério), Ju (Fisiologia), Willian (Fisiologia), Marquinhos (Parasitologia), Mara e Rosana (Secretaria), Rose e Vilma (Limpeza), vocês foram muito importantes nesta minha caminhada, pela ajuda com meu experimento, cada palavra amiga e pela pró-atividade em ajudar o próximo;

A secretária do PPGCV, Fátima, uma pessoa maravilhosa, tanto por fora quanto por dentro, que sempre me tratou de forma carinhosa, atenciosa e se tornou muito especial, que levarei para toda minha vida;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Geraldo, pela oportunidade que me concedeu, pela paciência, por todos os ensinamentos transmitidos, por todos conselhos profissionais e pessoais e estímulos ao longo de todo o trabalho;

Às minhas coorientadoras, Prof. Ana Paula e Prof. Elaine, pela amizade, carinho, por serem profissionais inspiradoras para mim e por todos ensinamentos e ajuda nesta fase da minha vida;

À coordenadora do PPGCV, Kitty, por toda ajuda, sensibilidade para com os pós-graduandos, sempre buscando nos auxiliar de alguma maneira;

À Universidade Federal de Lavras, por me proporcionar os melhores anos da minha vida e pela oportunidade de crescer profissionalmente;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

A todos que me ajudaram direta e indiretamente;

Hoje, as palavras me faltam para conseguir expressar o quanto sou e estou agradecida a todos vocês, mas deixo aqui o meu mais sincero...

**Muito obrigada!**

## RESUMO

A mastite bovina é um processo inflamatório da glândula mamária resultante da interação de fatores inerentes ao animal, patógenos e ambiente. A doença geralmente decorre da invasão microbiana da glândula mamária, principalmente por bactérias. Entre os principais microrganismos envolvidos em sua etiologia destaca-se o *Streptococcus agalactiae*, que geralmente acarreta índices elevados de novas infecções, afetando a quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal ou rebanho infectado. Em relação às medidas de controle e prevenção para a mastite bovina, a vacinação tem sido extensamente estudada com objetivos de reduzir novas infecções intramamárias e diminuir a duração e a gravidade dos casos existentes. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a antigenicidade de uma bacterina para o controle e prevenção da mastite bovina ocasionada por *S. agalactiae*. Para tal, foi confeccionada uma bacterina experimental adjuvada com hidróxido de alumínio, contendo os isolados de *S. galactiae* SA522 e SA199, numa concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de cada isolado. Para os testes de antigenicidade da vacina, foram utilizadas 45 vacas primíparas gestantes, pertencentes a uma fazenda leiteira localizada na região Sul de Minas Gerais livre de infecções por *S. agalactiae*, sendo 30 utilizadas no grupo vacinado e as demais (15), no grupo controle. Os animais do grupo vacinado foram vacinados pela via subcutânea, utilizando-se duas doses de 5 mL intervaladas de 21 dias. O grupo controle foi inoculado com 5 mL de solução fisiológica estéril. Previamente à vacinação, foi realizada a coleta de sangue e de leite de cada animal, para cultura de todos os quartos mamários de todos os animais, a fim de assegurar que eles eram livres de infecção por *S. agalactiae*. Sete dias após a segunda dose vacinal, foi realizada coleta de sangue dos animais de ambos os grupos para mensuração de anticorpos induzidos pela bacterina por meio de um teste de ELISA indireto padronizado para este fim. Adicionalmente, amostras de soro sanguíneo de vacas não infectadas e de vacas naturalmente infectadas pelo *S. agalactiae* foram submetidas ao teste de ELISA para a pesquisa de IgG contra o referido agente. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software R e pelo Software GraphPad Prism, sendo considerada uma diferença significativa de 5%. Foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) pelo teste T para o grupo vacinado antes da vacinação (D0) e após a segunda dose vacinal (D30) ( $p = 0,0056$ ). O grupo controle não apresentou alteração entre os momentos D0 e D30 ( $p = 0,3303$ ). A bacterina desenvolvida foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* nas vacas vacinadas e o teste de ELISA padronizado demonstrou ser efetivo na detecção de anticorpos séricos nestes animais. Não foi possível detectar anticorpos séricos nos animais naturalmente infectados, sugerindo a ausência de produção dos mesmos nas infecções naturais pelo *S. agalactiae* nos bovinos. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a imunogenicidade desta vacina em rebanhos infectados por *S. agalactiae*.

**PALAVRAS-CHAVES:** CCS. Mastite bovina. Resposta imune. Vacina.

## ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammatory process of the mammary gland due to the interaction of animals related to the animal, pathogen and environment. This disease is generally caused by microbial invasion of the mammary gland, mainly by bacteria. Among the main pathogens involved in its aetiology, *Streptococcus agalactiae* stands out, which determines the high clinical levels of new infections, leading to a decrease in the quantity and quality of milk produced by the infected animal or herd. Among the measures of control and prevention for bovine mastitis the use of vaccines has been extensively, aiming to reduce the level of new infections and duration and severity of cases. Therefore, the objective of this work was to develop and evaluate the antigenicity of one bacterin for the control and prevention of bovine mastitis caused by *S. agalactiae*. To this propose, it was produced an experimental bacterin adjuvanted with aluminum hydroxide, containing the strains SA522 and SA199 at the concentration of  $1 \times 10^9$  UFC / mL of each isolate. For antigenicity tests of vaccine, 45 pregnant cows belonging to a dairy farm located in the south of Minas Gerais, which were negative for *S. agalactiae* were used, as 30 in vaccinated group and 15 in control group. Animals of vaccinated group received two doses of bacterin (5mL/dosis) by the subcutaneous route with interval of 21 days. The control was inoculated with placebo (5 mL sterile saline). Previously to vaccination was performed blood and milk collecting blood from each animal in order to assure that they were not infected by *S. agalactiae*. Nine days after second vaccinal dosis (D30) blood collections of all animals of vacinal group and control groups were performed and dosages of anti-*S. agalactiae* immunoglobulins were done by indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Due to the lack of ELISA kits for anti-*S. agalactiae* antibodies in cattle, an ELISA standardization was performed for this purpose. In addition, blood serum samples from uninfected cows and cows naturally infected by *S. agalactiae* were subjected to the ELISA for the detection of IgG. Data were statistically analysed by Software R and GraphPad Prism Software, with a 5% statistical error level. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for test T, were observed for the vaccinated group before vaccination (D0) and after a second vaccine dose (D30) ( $p = 0.0056$ ). The animals of the control group didn't show differences in antibodies levels in D0 relation D30 ( $p = 0.3303$ ). The developed bacterin was able to induce the production of anti-*S. agalactiae* antibodies in vaccinated cows and the standardized ELISA test proved to be effective in the detection of serum antibodies in these animals. It was not possible to detect serum antibodies against *S. agalactiae* in the naturally infected animals, suggesting the absence of their production in natural infections of cattle caused by this pathogen. Future studies should be conducted to evaluate the immunogenicity of this vaccine in *S. agalactiae*-infected herds.

**KEYWORDS:** CCS. Bovine mastitis. Immune response. Vaccine

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do período experimental em bovinos.....	27
Figura 2 – Níveis de anticorpos anti- <i>S. agalactiae</i> em A) soros de novilhas vacinadas, B) soros de novilhas controle, nos momentos D0 e D30 do período experimental.....	37
Figura 3 – Níveis de anticorpos séricos anti- <i>S. agalactiae</i> de uma fazenda positiva e uma fazenda negativa para <i>S. agalactiae</i> .....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Mastite Bovina e importância econômica .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Streptococcus agalactiae</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Tipos de vacinas .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Adjuvantes.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Vacinas para controle da mastite bovina.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Vacinas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção da bacterina .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Curva de Crescimento e contagem bacteriana .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Preparo da vacina .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Bovinos e vacinação .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Coleta de amostras de animais vacinados .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Cultivo de amostras de leite para diagnóstico etiológico da mastite.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- <i>S. agalactiae</i> em bovinos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Curva de crescimento .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Padronização ELISA .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Produção da bacterina e análises sorológicas .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há uma demanda crescente por leite e outros produtos lácteos em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. O leite é uma excelente fonte de proteína de alta qualidade, além de conter muitas vitaminas e minerais essenciais que podem ser facilmente digeridos e absorvidos por todos os mamíferos. Por isso, é um dos alimentos naturais mais populares, sendo consumido globalmente por indivíduos de todas as faixas etárias (SHARMA et al., 2018).

A maior proporção de leite produzido para consumo humano é obtida do bovino. As vacas leiteiras convertem eficientemente alimentos e subprodutos não comestíveis para seres humanos em leite rico em nutrientes (VAN HOOIJDONK E HETTINGA, 2015).

A produção de leite do Brasil ocupa, no *ranking* mundial, a quinta posição, estando atrás da Índia, Estados Unidos, China e Paquistão (FAO, 2016). Em 2017 a produção nacional de leite foi de aproximadamente 35 bilhões de litros. O Estado de Minas Gerais é o principal produtor de leite do país, com produção estimada em 9,1 bilhões de litros, o que representa 76,8% da produção da região Sudeste e 26,1% da produção nacional (IBGE, 2018).

A produção mundial de leite é afetada por numerosos fatores e um dos mais importantes é a mastite, doença que pode ocasionar redução da produção dos animais afetados e afetar a qualidade do produto, acarretando grandes perdas econômicas para o produtor e para a indústria (KEEFE et al., 2012). Trata-se de uma doença de cunho multifatorial que tem no hospedeiro, no ambiente e nos agentes infecciosos, os fatores determinantes para sua ocorrência (PANG, 2017).

A mastite é um processo inflamatório que pode resultar de trauma, lesão, irritação química ou infecção microbiana no úbere (GUERREIRO et al., 2013) e geralmente decorre da invasão microbiana da glândula mamária por bactérias, principalmente, vírus, leveduras e algas (BI et al., 2016). Dentre os principais patógenos causadores de mastite bovina, destacam-se as bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* (CARVALHO-CASTRO, 2017).

O *Streptococcus agalactiae*, também referido como *Streptococcus* do Grupo B (GBS), é uma bactéria Gram-positiva que tem sido relatada como um importante patógeno, frequentemente associado à meningite e septicemia neonatal em seres humanos (LYHS, 2016), meningoencefalite em peixes (ASSIS et al., 2017) e mastite em bovinos (PANG et al., 2017).

A mastite bovina pode ser considerada a causa mais frequente de uso de antibióticos em vacas leiteiras. O uso indiscriminado e sem fundamentação técnica de antimicrobianos para o tratamento de doenças de origem bacteriana é uma possível causa do desenvolvimento da resistência microbiana (THOMAS et al., 2015). Para evitar o desenvolvimento da resistência aos mesmos, o tratamento deve ser limitado a situações nas quais os achados clínicos e bacteriológicos justifiquem seu uso (KACZOREK, 2017). Diante deste cenário, medidas de controle e formas de prevenção para a mastite bovina têm sido extensamente estudadas com objetivos de reduzir novas infecções intramamárias (IIM) e a duração dos casos existentes.

Com a utilização de programas específicos de controle e prevenção de mastite, as IIM por *S. agalactiae* tornaram-se raras em rebanhos da América do Norte e em algumas regiões da Europa (OLIVEIRA, 2013). No entanto, em outras regiões do mundo como alguns países da América do Sul, a prevalência de vacas com IIM causadas por *S. agalactiae* é geralmente alta. Em rebanhos leiteiros da Colômbia, as taxas de infecção por *S. agalactiae* em bovinos variaram entre 28 a 35% (REYES et al., 2015); no Brasil, Tomazi (2017) relatou que esse patógeno foi a terceira bactéria mais prevalente em casos de mastite clínica bovina em 20 rebanhos leiteiros do Sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Além disso, um estudo recente do nosso grupo de pesquisa apontou uma prevalência de 67% de infecção por *S. agalactiae* nos rebanhos da Região de Campos das Vertentes, no Sul de Minas Gerais (MESQUITA, 2017).

Dentre os programas de controle e prevenção da mastite, o Programa de Seis Pontos é reconhecido mundialmente como o conjunto de medidas mais eficazes para reduzir os prejuízos causados pela mastite (SANTOS, 2016). O Programa abrange os seguintes pontos: higiene da ordenha e do ambiente; antissepsia dos tetos (pré-dipping e pós-dipping); descarte de animais cronicamente infectados; manutenção de equipamentos de ordenha; terapia preventiva no período seco; e tratamento precoce dos casos clínicos (NMC, 1996).

Além dessas medidas clássicas de controle outras estratégias podem ser adotadas, tais como: proporcionar boa ambiência para os animais; monitoramento periódico do rebanho por meio da contagem de células somáticas (CCS), California Mastitis Test (CMT), teste da caneca e culturas microbiológicas; estimular a participação da equipe de ordenhadores no programa de controle da mastite; controle da qualidade da água; implantação da linha de ordenha; levantamento dos agentes etiológicos e dos perfis de resistência dos mesmos e o uso de vacinas (COSTA, 2008).

Vacinas atenuadas, inativadas ou recombinantes podem ser usadas no controle da mastite bovina. As vacinas são consideradas medidas complementares no programa de

controle e profilaxia da enfermidade, podendo reduzir a prevalência e a gravidade dos quadros clínicos. Essa redução ocorre nos casos de mastites ambientais causadas por coliformes (*E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.) e *S. aureus*, em rebanhos que utilizam a vacina (DELLAGOSTIN, 2017).

A vacinação contra os agentes que estão infectando o rebanho pode induzir uma resposta imune eficiente e duradoura, que reflete no controle da doença e na produtividade do rebanho (BAROCCHI, 2015). Para tal, se faz necessário a identificação e caracterização dos agentes causais das infecções intramamárias que ocorrem nos rebanhos, de modo a propiciar a adoção de medidas mais específicas de controle.

Diante deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver e avaliar a antigenicidade de uma bacterina para o controle e prevenção da mastite bovina ocasionada por *S. agalactiae*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mastite Bovina e importância econômica

A mastite ou mamite é um processo inflamatório da glândula mamária que ocorre como consequência da interação de fatores relacionados ao animal, aos patógenos e ao meio ambiente (OLATOYE, 2018). Em relação aos patógenos, a mastite pode ser causada por diferentes microrganismos, como fungos, algas, e vírus, e, principalmente, pelas bactérias. Os patógenos que podem ser classificados como contagiosos ou ambientais de acordo com o nicho onde se encontram. Os primeiros incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*. Eles se adaptam ao ambiente da glândula mamária e sua transmissão se dá, normalmente, durante a ordenha. Os agentes ambientais incluem os coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp., fungos, dentre outros. Esses são descritos como patógenos oportunistas e têm, no ambiente, seu local de manutenção. As infecções por estes agentes ocorrem normalmente no intervalo entre ordenhas (BI et al. 2016).

Embora cerca de 137 microrganismos diferentes possam estar envolvidos na etiologia da mastite bovina, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis* e *E. coli* são responsáveis por cerca de 80% dos casos. Menos de 5% das infecções são causadas por *C.*

*bovis*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Serratia* sp. e *Prototheca* sp. (RANJAN et al., 2006).

A mastite é classificada de acordo com a severidade como clínica e subclínica. A evolução da infecção dependerá da natureza do agente etiológico e de fatores associados ao hospedeiro como idade, raça, estado imunológico e fase de lactação (FRAGKOU, 2014).

A mastite clínica é caracterizada pela apresentação de sinais visíveis com alterações macroscópicas no úbere: dor a palpação, rubor, aumento da temperatura local e vermelhidão, sendo de fácil diagnóstico (SANTOS, 2016). Esta forma é comumente associada a alterações da composição do leite, gerando o aumento do pH e da CCS (Contagem de Células Somáticas) do leite e reduzindo o teor da lactose e gordura, reduzindo o rendimento e a qualidade do leite (GOLDER, 2016). A depender da intensidade dos sinais clínicos, a mastite pode ser classificada em graus 1, 2 ou 3. Na mastite de grau 1, ocorrem apenas alterações nas características do leite, que se torna mais amarelado, com presença de pus, sangue e grumos. No grau 2 essas alterações são mantidas e o úbere apresenta sinais de doença, como inchaço, dor ao toque e vermelhidão. Na mastite de grau 3, o animal apresentará, além das manifestações previamente citadas, alterações sistêmicas, como febre, inapetência, desidratação e redução drástica na produção de leite (FRAGKOU, 2014).

A mastite subclínica é caracterizada pela ausência de sinais visíveis. É mais persistente e contagiosa, pois os animais são assintomáticos, levando ao diagnóstico tardio (GUERREIRO et al., 2013). Sob o ponto de vista econômico, a mastite subclínica possui maior importância devido ao grande número de animais acometidos, além de causar alterações físico-químicas na qualidade do leite e redução expressiva na produção. Isso ocasiona perdas da produção leiteira dos quartos afetados, prejuízos esses que podem chegar a 40% da produção por quarto afetado (CONTRERAS, 2011).

O diagnóstico correto da etiologia das infecções intramamárias de bovinos é essencial para que seja possível avaliar a importância relativa de cada um dos agentes envolvidos. Dessa forma, a adoção de medidas profiláticas pode ser readequada para os patógenos mais relevantes dentro do rebanho. A execução dessas medidas pode ser realizada por meio de métodos diretos ou indiretos. Entre os métodos diretos a cultura bacteriológica é considerada a técnica padrão para se estabelecer o estado sanitário da glândula mamária em relação à ocorrência de IIM (DUARTE, 2015). Em relação aos métodos indiretos, a avaliação das características físico-químicas do leite, incluindo a contagem de células somáticas (CCS), mensuração do pH, condutibilidade e dosagens de caseína, lactose, gordura e cloretos, são recursos comumente utilizados para detecção da mastite subclínica. Em condições de campo,

o diagnóstico dessa forma de apresentação é feito pelo California Mastitis Test (CMT) ou pelo Wisconsin Mastitis Test (WMT), além da mensuração da condutibilidade do leite (FRAGKOU, 2014).

Devido à relevância da mastite bovina, é fundamental o estabelecimento de programas efetivos de controle para a melhoria ou manutenção da qualidade do leite (SANTOS, 2016). A metodologia do controle da doença vem evoluindo nos últimos anos, passando do tratamento preventivo ou curativo do indivíduo para o plano do rebanho, com a adoção de programas mais abrangentes aplicados ao conjunto de rebanhos de uma região ou de um país (TOMAZI et al, 2017). Este conjunto de medidas é conhecido como Programa dos Seis Pontos.

O Programa dos Seis Pontos para controle da mastite é mundialmente conhecido como o conjunto de medidas mais eficazes para redução dos prejuízos causados pela doença. Os produtores de leite se empenham na adoção deste programa, uma vez que a sua implantação criteriosa propicia retorno econômico decorrente do controle da doença. O programa consiste em: 1) desinfecção de tetos antes e após a ordenha; 2) tratamento precoce de casos clínicos; 3) terapia de vacas secas; 4) higiene ambiental e da ordenha; 5) manutenção periódica do equipamento de ordenha e 6) descarte de animais cronicamente infectados (SANTOS, 2016).

Embora nas últimas décadas tenham ocorrido enormes avanços nas áreas de prevenção e controle da mastite, a mesma permanece como a doença infecciosa mais prevalente e economicamente relevante de bovinos leiteiros em todo o mundo (ISMAIL, 2017). Down et al. (2017) relataram que a mastite é a enfermidade que mais demanda a utilização de antimicrobianos. Hao et al. (2014) observaram que essa crescente necessidade de medicamentos veterinários no mercado internacional aumentou de 8,65 bilhões de dólares em 1992 para 20 bilhões de dólares em 2010 e estimou que atinja 42,9 bilhões de dólares até final de 2018. Já no mercado nacional, Lopes et al. (2012), tendo como referência uma vaca em lactação, estimaram o custo médio de R\$ 727,13 a R\$ 2.774,11 com gastos provenientes da mastite clínica.

## **2.2 *Streptococcus agalactiae***

O gênero *Streptococcus* abrange diversas espécies associadas a processos infecciosos em seres humanos e animais, bem como microorganismos saprofíticos ou não patogênicos. *S. agalactiae*, além de ser uma das principais espécies do gênero, é caracterizada por colonizar múltiplos hospedeiros e se adaptar em diferentes sítios do corpo. Atualmente, são descritas 129 espécies e 23 subespécies bacterianas pertencentes a este gênero (LIST OF

PROKARYOTIC NAMES, LPSN, 2018) que compreende bactérias Gram positivas, catalase e oxidase negativas, apresentando morfologia de cocos agrupados em duplas ou cadeias. É classificada como não móvel, não formadora de endosporo, anaeróbia facultativa e homofermentativa. As bactérias deste gênero podem produzir hemolisinas classificadas como beta, alfa ou gama hemolítica, que causam uma lise completa, parcial ou ausência de lise, respectivamente (CARVALHO-CASTRO, 2013).

*S. agalactiae*, também denominado *Streptococcus* do Grupo B (GBS) é subdividido em 10 sorotipos distintos, variando na composição do polissacarídeo com base na reatividade com anti-soros específicos, utilizando os testes de Lancefield ou de aglutinação em látex (ROSINI et al, 2015). A capacidade de multiplicação e colonização de diferentes ambientes depende da expressão de genes relacionados à virulência (CARVALHO-CASTRO, 2017). Produzem o fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) que é uma proteína secretada com propriedade de induzir a formação de poros (SILVA et al., 2015).

O GBS permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre seres humanos recém-nascidos, acarretando meningite e septicemia (KOBAYASHI et al., 2016) além de casos de infecções invasivas em idosos e imunocomprometidos, incluindo pacientes com diabetes *mellitus*, alcoolismo e câncer (PIMENTEL et al., 2016). A patogênese de *S. agalactiae* em seres humanos está associada à capacidade da bactéria de invadir e atravessar barreiras anatômicas, como o epitélio vaginal ou cervical (OLIVEIRA et al., 2018).

A doença invasiva causada por *S. agalactiae* não se limita apenas aos seres humanos. Outras espécies afetadas incluem aves, camelos, cães, equinos, gatos, rãs, hamsters, camundongos, macacos e espécies aquáticas ou semi-aquáticas, como mamíferos marinhos e peixes (DELANNOY et al., 2013). Na piscicultura, esse microrganismo é um grande problema, pois causa septicemia e meningoencefalite em peixes de diferentes espécies e ambientes, gerando altas taxas de mortalidade, que culminam em grandes prejuízos econômicos (BARONY et al., 2017), além de comprometer a segurança alimentar devido ao risco zoonótico (DELANNOY et al., 2013). Adicionalmente, esse microrganismo tem se destacado como um importante causador de mastite em bovinos. Geralmente não sobrevive por longos períodos fora da glândula mamária e a principal via de infecção se dá por contato direto ou por fômites contaminados (KEEFE, 2012).

O *S. agalactiae* destaca-se como agente causador de mastite por determinar elevados índices de contagens de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), acarretando em decréscimo na quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal ou

rebanho infectado. Podem ser observadas infecções subclínicas, clínicas ou crônicas (TOMAZI, 2017).

Costa et al. (2012), ao estudarem comparativamente as glândulas infectadas pelos patógenos contagiosos, observaram que aquelas infectadas por *Streptococcus* spp. geralmente apresentavam CBT e CCS superiores às aquelas infectadas por *Staphylococcus* spp. coagulase positivos (SCP), *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN) ou *Corynebacterium bovis*.

No Brasil, Tomazi (2017) relatou que *S. agalactiae* foi a terceira bactéria mais prevalente em estudo que envolveu 20 rebanhos leiteiros da região Sudeste. Oliveira et al. (2013b) estudaram a etiologia da mastite em uma população composta por 112 rebanhos com aproximadamente 6.000 vacas em lactação localizadas nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, tendo verificado que a frequência para *S. agalactiae* foi de 41,0%. Ademais, Mesquita (2017) relatou a prevalência de *S. agalactiae* em 67% dos rebanhos da região de Campos das Veredentes, no sul de Minas Gerais. A presença deste agente em países onde os programas de controle estratégico contra a mastite foram bem estabelecidos é indicativa de falhas no manejo e em programas de biossegurança (CARVALHO-CASTRO, 2013).

Segundo Keefe (2012), o *S. agalactiae* trata-se de um agente altamente contagioso, que causa quadros de mastite com baixa taxa de cura espontânea, mas que geralmente responde bem à antibioticoterapia, o que possibilita a adoção de programas de erradicação centrados no tratamento coletivo dos animais em lactação. Uma estratégia bastante utilizada para o controle das infecções intramamárias causadas por este é a chamada blitzterapia, que consiste no tratamento de todo o rebanho ou apenas dos animais comprovadamente infectados pelo agente (ASSIS, 2017).

### **2.3 Tipos de vacinas**

Vacina é conceituada como uma preparação de imunógenos combinados ou não a adjuvantes que, ao serem introduzidas no organismo vivo, induzem uma reação do sistema imunológico semelhante à que ocorreria no caso de uma infecção natural por um determinado agente patogênico. Sua principal ação é desencadear a produção de anticorpos e ativação de células específicas que tornarão o organismo imune ou mais resistente ao agente presente na vacina (DICIO, 2018). A vacinação demonstrou ser uma ferramenta promissora no controle e na erradicação de muitas doenças em todo o mundo, como nos casos da varíola e a da poliomielite. (SHARMA, 2018).

As vacinas veterinárias são candidatas ideais para promover a saúde e o bem-estar animal, pois ajudam a prevenir as infecções, aumentam a produtividade dos rebanhos, reduzem o consumo de drogas antimicrobianas e mitigam os impactos da resistência aos antibióticos, reduzindo a ocorrência de infecções zoonóticas e de origem alimentar nos seres humanos (FOUNOU, 2016).

Os avanços tecnológicos fornecem oportunidades para o desenvolvimento de novas vacinas. Desde Pasteur, as vacinas foram desenvolvidas usando abordagens empíricas que consistem principalmente em microrganismos mortos ou vivos atenuados, componentes purificados de patógenos completos (subunidades vacinais), toxinas inativadas ou polissacarídeos. A partir da década de 1980, novas tecnologias tornaram possível a criação de vacinas mais complexas: DNA recombinante, glicoconjugação de polissacarídeos, vacinologia reversa e sequenciamento de nova geração que, juntamente com a biologia molecular, criam novas alternativas para o desenvolvimento de vacinas mais efetivas (BAROCCHI, 2015).

Em geral, as vacinas convencionais podem ser de três tipos: (i) Vacinas recombinantes, nas quais se utiliza um fragmento purificado do patógeno, visando induzir resposta imune; (ii) Vacinas atenuadas, que são compostas de microrganismos vivos atenuados que foram cultivados sob condições que incapacitem suas propriedades virulentas ou que usem microrganismos intimamente relacionados; e (iii) Vacinas contendo microrganismos mortos, que são inativados por produtos químicos ou calor (DELLAGOSTIN, 2017).

As vacinas recombinantes são classificadas em três grupos, isto é, vacinas de DNA ou RNA, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas. O desenvolvimento da vacina recombinante envolve a clonagem do fragmento de DNA em um vetor. Avanços adicionais em engenharia genética e bioinformática permitem a identificação e síntese de epitopos com capacidade de desencadear a resposta imune, resultando no desenvolvimento de vacinas recombinantes (RIOS, 2016).

As vacinas vivas atenuadas passam por um processo de atenuação pelo qual a virulência (patogenicidade) do agente infeccioso é reduzida de forma segura, para não causar a doença, mas ao mesmo tempo, é capaz de estimular a resposta imunológica. O agente patogênico é enfraquecido por meio de passagens sucessivas por um hospedeiro não natural, ou em meio de cultivo que lhe seja desfavorável. Portanto, quando inoculado num indivíduo, multiplica-se sem causar doença, estimulando o sistema imunológico. Normalmente, estas vacinas são eficazes apenas com uma dose (com exceção das orais). Contudo, existe um

pequeno risco de que o agente atenuado possa sofrer reversão de virulência (BAROCCHI, 2015).

Nas vacinas inativadas, o agente infeccioso é inativado, por exemplo, com formaldeído e se torna incapaz de multiplicar, no entanto, sua estrutura e seus componentes antigênicos conservam a capacidade de estimular o sistema imunológico do hospedeiro. Este tipo de vacina promove uma baixa indução de resposta imune celular, apresentando maior capacidade de induzir a resposta imune humoral e, por isso, faz-se necessário a utilização de doses de reforço, para manutenção da resposta imune (DELLAGOSTIN, 2017).

## **2.4 Adjuvantes**

Adjuvantes imunológicos são substâncias capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura (MOTA, 2006).

Os benefícios potenciais do uso de adjuvantes em vacinas incluem uma resposta imunológica mais rápida, forte, ampla e durável, que pode ou não ser alcançada a depender da vacina e da população alvo vacinada. Outras vantagens potenciais dos adjuvantes incluem a preservação do antígeno, devido a redução da exposição do mesmo no indivíduo vacinado, permitem, ainda, a produção de um número maior de doses e uma vida útil potencialmente mais longa (SCHIJNS, 2011). A disponibilidade de novos adjuvantes e novas combinações de adjuvantes está possibilitando o desenvolvimento de novas vacinas que podem ajudar a proteger contra patógenos desafiadores.

Essa característica dos adjuvantes é particularmente importante para vacinas contendo antígenos altamente purificados que apresentam baixa capacidade imunoestimulatória. Os adjuvantes também podem, portanto, melhorar a imunidade em populações que respondem mal a vacinas não adjuvadas, como recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos (LAUNAY et al., 2013).

A resposta imune, após a exposição a um patógeno (ou vacina), ocorre em duas fases: a resposta imune inata (inicial) que identifica o patógeno e desencadeia uma série de respostas rápidas, porém inespecíficas, que direcionam as ações da resposta adaptativa (posterior). Dentre as células efetoras da resposta imune inata destacam-se os neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas. O reconhecimento de um patógeno inicia com a liberação de citocinas, proteínas de fase aguda e quimiocinas pelas células efetoras. Juntamente com as células apresentadoras de antígenos, esses mecanismos são responsáveis pela interação entre

as células efectoras inatas e adaptativas e determinam a natureza e a magnitude da resposta imune adaptativa (DA SILVA, 2015).

Em diversas vacinas veterinárias, são utilizadas substâncias adjuvantes como hidróxido de alumínio, saponina, avridine, entre outros, que conseguem amplificar a resposta inflamatória inicial induzida pela vacinação e aumentar a resposta imune a antígenos específicos (DA SILVA, 2015).

O hidróxido de alumínio foi utilizado pela primeira vez em vacinas humanas em 1932 e foi o único adjuvante em uso nas vacinas licenciadas por, aproximadamente, 70 anos. Apesar de seu uso extensivo e contínuo, o mecanismo imunológico de ação do alumínio ainda é pouco compreendido (PASQUALE, 2015). Segundo Marrack (2009), os adjuvantes de alumínio atuam principalmente na indução de resposta humoral e aumento da migração macrófágica e neutrófila para o sítio de inoculação ().

Nem todas as vacinas necessitam de adjuvantes. As vacinas vivas atenuadas são eficazes porque induzem uma infecção leve nos hospedeiros e uma resposta imunológica muito semelhante àquela induzida pela infecção por cepas do tipo selvagem. Ou seja, essas vacinas são capazes de iniciar uma resposta imune inata, o que impulsiona as respostas adaptativas subsequentes (LAUNAY et al., 2013).

## **2.5 Vacinas para controle da mastite bovina**

O controle da mastite depende mais da prevenção que de tratamentos. Sendo assim, uma importante estratégia é a vacinação, responsável pelo aumento da capacidade da resposta imune do animal (BRADLEY, 2015). O desenvolvimento de vacinas contra patógenos comuns do úbere tem avançado nas últimas décadas), principalmente para mastites ambientais causadas por coliformes (*E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.) e *S. aureus* (ISMAIL, 2017; DELLAGOSTIN, 2017).

A ideia da utilização de vacinas produzidas a partir dos agentes infecciosos isolados de um dado paciente para promover a cura do mesmo foi desenvolvida no início do século XX por Sir Almroth Edward Wright. Estas vacinas são conhecidas como vacinas autógenas, que podem ser classificadas como monovalentes ou polivalentes. Produzidas com microrganismos isolados de animais sacrificados ou enfermos, essas são inativadas, imunogênicas, não tóxicas e inócuas, utilizadas no controle e prevenção de enfermidades da espécie alvo (MOUDGIL, 2017).

A maioria das vacinas comerciais contra mastite bovina é composta por uma cepa mutante da *E. coli*, a cepa *E.coli* J5. Esta possui um antígeno do núcleo lipopolissacarídeo (LPS) relativamente exposto, sendo esse comum às demais bactérias Gram-negativas, capazes de estimular a resposta imune do animal contra coliformes. Geralmente, as vacinações coincidem com o período de maior risco de infecções intramamárias por coliformes: no início e no fim do período seco e após o parto (BRADE, 2012).

Outro patógeno relevante da mastite bovina em cujo controle vacinas tem sido utilizada é o *Staphylococcus aureus*. Existem várias abordagens que tem sido explorada para o desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus*. Podem ser citadas as das vacinas de organismos inteiros, como *S. Aureus* atenuado vivo, vacinas conjugadas de polissacarídeo capsular, vacinas de DNA, que codificam o fator A aglutinante, e enterotoxina recombinante de *S. aureus* tipo C (TIWARI et al., 2013).

Em algumas circunstâncias, a vacinação é capaz de aumentar as concentrações de anticorpos no soro e no leite após o parto, além de reduzir significativamente as perdas na produção de leite causadas por esta doença. No estudo de Bradley (2015), que testou a vacina polivalente disponível comercialmente (Startvac®, Hipra, Espanha) contendo *E.coli* J5 e *S. aureus* estirpe SP140, no Reino Unido, as vacas vacinadas produziram significativamente mais leite e mais sólidos no leite em relação às vacas não vacinadas.

Uma vantagem significativa da vacinação contra a mastite bovina é possibilidade de redução do uso de antimicrobianos. A presença e disseminação de bactérias resistentes aos medicamentos resultam de uma miríade de fatores ecológicos e evolutivos que interagem, sejam naturais ou movidos pelo ser humano (MOUDGIL, 2017). A dependência generalizada do uso de antimicrobianos em animais resulta em uma pressão seletiva sob a qual as bactérias podem desenvolver mutações ou adquirir genes de resistência. Segundo Sharma (2018), o uso de agentes indiscriminado de antimicrobianos é a principal força motriz no desenvolvimento e disseminação de resistência (.

A resistência aos antimicrobianos afeta diversas populações e requer uma estratégia de tratamento e prevenção de baixo custo e eficaz para o bem-estar animal e para a saúde pública (FRIDKIN, 2015). A vacinação é uma alternativa apesar de ser, no geral, “patógeno-específico”. Neste sentido, considerando que a mastite em bovinos é causada por diversos microrganismos, a vacinação contra um único patógeno não irá eliminar novas infecções causadas por microrganismos que não são alvos da vacina (SANTOS & TOMAZI, 2012).

Embora o desenvolvimento de uma vacina possa ser dispendioso (TIWARI, 2013), muitas vezes a principal força motriz por trás da seleção da população-alvo é o benefício

clínico e potencialmente a relação custo-benefício (LEE et al., 2017). A imunoprofilaxia da mastite requer o desenvolvimento de vacinas mais potentes e seguras, com proteção mais ampla contra múltiplos patógenos.

### 2.5.1 Vacinas contra *Streptococcus agalactiae*

Vacinas para o controle de infecções ocasionadas por *S. agalactiae* tem sido mais empregada para seres humanos e peixes, existindo poucos estudos sobre seu uso em bovinos. Em 2011, foi aprovada no Brasil a primeira vacina inativada contra *S. agalactiae* para uso na piscicultura (Aquavac® STREP as), de aplicação por via intraperitoneal que, em condições experimentais, apresenta uma porcentagem de sobrevivência relativa de 84% nos peixes vacinados e desafiados com *S. agalactiae* por via intraperitoneal (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012).

A principal indicação para as vacinas em seres humanos contra GBS é a prevenção de infecções neonatais por GBS (até 2 a 3 meses de idade). A doença ocorre precocemente em recém-nascidos e, na maioria dos bebês, a doença por GBS está presente no primeiro dia de vida, impedindo a vacinação do recém-nascido como estratégia preventiva (GUPALOVA et al., 2018).

Embora várias abordagens tenham sido usadas para desenvolver vacinas contra *S. agalactiae* para uso em seres humanos, as publicações sobre vacinas contra *S. agalactiae* como agente causador de mastite são escassas (LIU, 2017). Alguns exemplos de estudos, como Calzolari et al., (1997) desenvolveram uma vacina inativada contra *S. agalactiae*, testada em 30 novilhas prenhas em diferentes tempos de gestação. Porém, os estudos indicaram que não houve efeito imunológico sobre a infecção intramamária por *S. agalactiae*. No entanto, em outra pesquisa, a proteína X, um antígeno de superfície, foi usada como um potencial imunógeno para desenvolver uma vacina e as vacas desenvolveram anticorpos que eram opsonizantes para *S. agalactiae*, aumentando sua fagocitose (RAINARD, 1994).

Ahmad (2008) desenvolveu uma vacina inativada com adjuvante de hidróxido de alumínio contra *S. agalactiae* e *S. aureus* a partir de isolados de leite de búfalas com mastite e a resposta imune foi avaliada em coelhos. Os títulos de anticorpos séricos (IgG) foram significativamente maior no grupo vacinado quando comparado ao grupo controle. Margarit (2009) desenvolveu uma vacina com componentes de pilus de *S. agalactiae*, apresentando capacidade de induzir altos títulos de anticorpos opsonofagocíticos, os quais protegeram os camundongos vacinados, tanto na imunização ativa quanto na passiva. O mais notável deste

estudo foi que, quando os componentes das três ilhas de pilus foram combinados, 94% de proteção foi conferida contra cepas contemporâneas de GBS que circulam nos Estados Unidos e na Itália.

Magas et al. (2013) desenvolveram uma vacina autógena preparada de duas cepas SAU 7 (*S. aureus*) e SAG 3 (*S. agalactiae*) e observaram que as concentrações de imunoglobulina IgG no leite das vacas vacinadas foram significativamente maiores que nas vacas não vacinadas. Sayed et al. (2015) prepararam e avaliaram uma vacina polivalente contra *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Foram inoculadas 20 vacas prenhes por via intramuscular dois meses antes do parto e foi feito o reforço no 21º dia pós-parto. Os resultados apontaram uma redução na incidência e na gravidade dos casos clínicos de mastite no grupo vacinado.

A vacinação pode ser uma estratégia eficaz de controle da mastite causada por *S. agalactiae*, com objetivo de fornecer imunidade direcionada (RIOS, 2016). Desta forma, os mecanismos de controle poderiam atuar de forma conjunta e mais eficiente tanto na prevenção de novas infecções, quanto na eliminação de infecções existentes.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver uma bacterina contra *S. agalactiae* e avaliar a resposta imune humoral induzida pela mesma em bovinos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

I-Desenvolver uma bacterina contra *S. agalactiae* para uso em bovinos.

II-Padronizar um teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*S. agalactiae* em bovinos vacinados com bacterina contra *S. agalactiae* e bovinos naturalmente infectados pelo agente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção da bacterina

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Lavras sob o registro 027/2017.

Para a produção das bacterinas autógenas, foram seguidas as normas da IN nº 31, de maio de 2003 que aprova o regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas autógenas em rebanhos (MAPA, 2003).

Para a confecção da bacterina foram utilizadas duas cepas genotipicamente distintas de *S. agalactiae*, sendo elas SA199 e SA522, isoladas de casos de mastite bovina de rebanhos brasileiros. A escolha destas cepas foi baseada no trabalho de Carvalho-Castro et al. (2017) que realizaram a caracterização molecular de isolados de *S. agalactiae* de cinco estados brasileiros e, por meio das técnicas de Multi Locus Sequence Typing (MLST) e tipagem capsular. O isolado SA199 teve origem de mastite clínica do Estado de Minas Gerais, tipo capsular III e ST (Sequence Type) 61. Já o isolado SA522, originou-se de mastite subclínica do Estado de São Paulo, tipo capsular IV e ST 570.

#### 4.1.1 Curva de Crescimento e contagem bacteriana

Para determinação da curva de crescimento dos isolados de *S. agalactiae* utilizados na produção da bacterina, a quantificação celular foi estimada por meio da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 540 nm e posterior contagem em placas, utilizando-se a técnica de Milles Misra (TORTORA, 2005). Os isolados SA199 e SA522 foram cultivados em tubo contendo o meio “Brain and Heart Infusion” (BHI) (HIMEDIA®) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os inóculos foram transferidos isoladamente para frascos Erlenmeyer contendo 300 mL de BHI + soro bovino (7%). Três horas após a inoculação do meio, 2 mL foram retirados para mensuração da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas em solução salina a 0,95% ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ). As diluições seriadas foram plaqueadas em Ágar Muller Hinton suplementado com soro equino a 5% e, após a incubação a 37°C por 24 horas, foi realizada a contagem do número de células viáveis por mL. Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada três horas, ao longo das 24 horas de incubação das culturas a 37°C. Um frasco contendo BHI + soro bovino (7%) estéril foi utilizado ao longo do experimento para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação

da densidade óptica. Para a montagem da curva do número de células viáveis por mL de meio de cultura foram utilizados os valores das diluições que apresentaram nas contagens, entre 30 e 300 colônias. O número de microrganismos viáveis na suspensão foi calculado e expresso como unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de cultura. Ao final do experimento, foi realizada a confirmação de pureza do microrganismo no meio de cultura. Todos os ensaios desta etapa do experimento foram realizados em duplicata.

#### **4.1.2 Preparo da vacina**

A vacina foi preparada com os dois isolados, SA199 e SA522, com proporção de 1:1, previamente caracterizados por testes fenotípicos e moleculares. Ambas as cepas foram cultivadas separadamente em meio BHI suplementado com 7% de soro sanguíneo, obtido de bovino jovem e sadio, por 48 h a 37°C. Após o cultivo, as culturas foram inativadas por adição de formaldeído (Formaldeído 37% P.A. Labsynth®) na proporção final de 1% e repouso por 24 horas a 37°C. Após a inativação, as culturas foram avaliadas quanto à pureza por esfregaços corados pela técnica de Gram e esterilidade, por meio do plaqueamento das mesmas em ágar sangue, que foi incubado a 37°C por 24-48 h. A ausência do crescimento de bactérias confirmou que a cultura foi inativada com sucesso. Após essas etapas, as culturas foram centrifugadas a 10.000x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em solução de NaCl a 0,9%, pH 7,0.

Foi adicionado hidróxido de alumínio a 2,5% (peso/volume) como adjuvante e Timerosal a 0,01% (peso/volume) como conservante. A vacina ficou sobre agitação por 24h. Com base na curva de crescimento, a suspensão bacteriana foi ajustada de modo a conter  $1,0 \times 10^9$  bactérias/mL de cada isolado, em dose vacinal de 5 mL.

O teste de inocuidade foi realizado com a aplicação da vacina em dose vacinal de 1mL em 4 camundongos de 30 a 40 dias de vida, por via subcutânea e outros 4 camundongos utilizados como controle. Os camundongos foram observados durante 21 dias.

#### **4.1.3 Bovinos e vacinação**

Quarenta e cinco vacas gestantes, primíparas, da raça Holandesaa, com idade de 24 a 36 meses, alojadas em sistema semi-confinado, com produção média de 28 litros de leite por dia por animal, pertencentes a uma fazenda leiteira localizada na região Sul de Minas Gerais, sabidamente negativa para *S. agalactiae*, foram utilizadas no estudo. Foram aplicadas 2 doses

de vacina pela via subcutânea com intervalo de 21 dias. O grupo vacinado (GV) foi composto por 30 vacas primíparas e o grupo controle (GC), por 15 vacas primíparas, inoculadas com placebo (5 ml de solução fisiológica estéril)

A fazenda selecionada para a realização do estudo era sabidamente negativa para *S. agalactiae* em função de estudos prévios realizados na mesma. E, previamente à vacinação, foi realizada a coleta de sangue e leite de cada animal para cultura dos quartos mamários de todos os animais, a fim de confirmar que os mesmos não estavam infectados por *S. agalactiae*.

Além dos animais utilizados para teste da bacterina, foram empregados soros de 26 vacas de uma fazenda leiteira com histórico e culturas microbiológicas positivas para *S. agalactiae*, sendo 12 animais positivos e 14 negativos na cultura microbiológica do leite para o referido agente. Os soros dos animais foram utilizados para quantificação de anticorpos (IgG) anti-*S. agalactiae*, empregando-se o de ELISA que foi padronizado neste estudo.

A fazenda leiteira positiva para *S. agalactiae* estava localizada na região Sul de Minas Gerais, empregava sistema de semi-confinamento, com animais da raça Girolando, com produção individual média de 20 litros/dia.

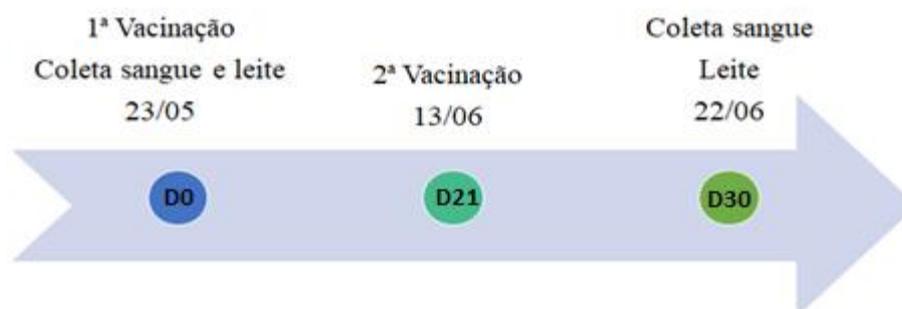
#### **4.1.4 Coleta de amostras de animais vacinados**

As coletas de sangue foram realizadas nos dias zero (D0) e trinta (D30) (Figura 1). Para a coleta asséptica das amostras de leite submetidas à cultura microbiológica, os procedimentos foram: imersão dos quartos em solução de iodo 0,5% e secagem individual dos mesmos com papel-toalha descartável, conforme preconizado por Veiga (1998). Em seguida foram desprezados os três primeiros jatos de leite de cada quarto. Foi realizado o teste de CMT (California Mastitis Test) para identificação de mastite subclínica e coleta de amostras provenientes de leite dos quatro quartos mamários (reagentes e não reagentes) em tubo estéril e resfriadas em gelo a 4-8°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à cultura microbiológica visando identificar infecção por *S. agalactiae*.

A coleta de sangue para a obtenção de soro visando à realização do ELISA foi realizada em tubos siliconizados (sem anticoagulante) que continham vácuo e, utilizando-se agulhas individuais e descartáveis. Foram coletados 5 mL de sangue de cada animal por punção da veia coccígea, posteriormente a antissepsia do local com álcool 70%. Para a obtenção do soro, os tubos com sangue foram mantidos à temperatura ambiente por 2 h ao abrigo da luz, até que ocorresse a coagulação sanguínea. Após a coagulação as amostras de

sangue foram centrifugadas a 2.800x g por 5 minutos e os soros transferidos para frascos estéreis que, em seguida, foram congelados a -20°C até a realização dos ensaios.

Figura 1 – Fluxograma do período experimental em bovinos



Legenda: O período experimental *in vivo*, foi dividido em três tempos. D0) 1ª Vacinação – ocorreu a coleta de sangue e de leite de todos os animais participantes do estudo. D21) A segunda dose da bacterina no grupo vacinado. D30) Realizada a coleta de sangue e leite de todos os animais do estudo.

Fonte: Do Autor (2018).

#### 4.1.5 Cultivo de amostras de leite para diagnóstico etiológico da mastite

As amostras de leite das vacas utilizadas na avaliação da bacterina e dos animais provenientes do rebanho naturalmente infectado pelo *S. agalactiae* foram cultivadas em placas contendo agár sangue que foi incubado a 37°C por 24 horas e os isolados identificados de acordo com o as diretrizes do NMC (2004).

#### 4.1.6 Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *S. agalactiae* em bovinos

A pesquisa de anticorpos contra o *S. agalactiae* nos animais vacinados e nos animais naturalmente infectados por este agente foi realizada por meio de ELISA padronizado para este fim no Laboratório de Microbiologia do DMV – UFLA.

Para a preparação dos antígenos para o ELISA indireto foram testados dois métodos diferentes de lise bacteriana com intuito de obter o melhor rendimento de proteínas totais. Em ambos os protocolos, foram utilizadas culturas de *S. agalactiae* SA199 e SA522 em 300mL de BHI + soro bovino (7%) incubadas a 37°C durante 24 h.

O primeiro método testado foi pelo kit comercial B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent (ThermoScientific) de acordo com as recomendações do fabricante. O segundo

método foi por sonicação mecânica do agente. Resumidamente, após a incubação, 2mL de cultura do caldo foram centrifugados a 2.800x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspense em 2 mL solução salina a 0,95%. As células foram ressuspensas em tampão de lise resfriado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 5% de glicerol (v/v), 1 mM DTT, 1 mM PMSF) em uma proporção de 1 g de peso úmido de células para 1 ml de tampão de lise. Em seguida, a suspensão de células arrefeceu-se no gelo por 10 minutos e foi adicionado o PMSF (10 µl PMSF (100 mM) por ml de célula suspensa). Posteriormente, a suspensão de células foi sonicada com 10 ciclos curtos de 10 segundos seguidos de intervalos de 30 segundos para resfriamento. Em seguida, foram removidos os detritos celulares por ultracentrifugação a 4°C por 1 hora a 25.000 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -20°C para uso em ensaios.

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo Método de Bradford, utilizando-se uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (BRADFORD, 1976).

Foi empregada a técnica de titulação em tabuleiro de xadrez (*chessboard titration* – CBT), técnica que consiste em variar um dos reagentes que se deseja analisar entre as linhas da placa de ELISA e outro reagente entre as colunas. No caso, variou-se a concentração do antígeno e do anticorpo específico entre as colunas e a concentração dos soros entre as linhas (CROWTHER, 2009).

No desenvolvimento do ELISA indireto foram utilizadas placas de 96 poços Nunc MaxiSorp™ sensibilizadas com 100µL de antígeno bacteriano previamente diluído em tampão carbonato a 0,06 M pH 9,6 nas concentrações testes (0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 2,0 µL/well) e incubadas overnight a 4°C para adsorção do mesmo na superfície da placa. Após cada incubação, as placas eram lavadas quatro vezes com Tampão fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T).

Para a realização dos testes as placas foram, inicialmente, bloqueadas com 200µL de PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por poço por 4h a 37°C. Os soros testes foram diluídos (1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600 e 1:3200) em PBS-T + 1% de leite em pó desnatado distribuídos nas placas (100µL/poço) e incubados por uma hora a 37°C. Cada amostra testada foi submetida a três replicatas por placa e duas repetições, totalizando avaliações por amostra. Após a incubação a 37°C por 1h com 100 µL de anticorpo secundário espécie-específico (anti-IgG bovino conjugado com peroxidase – KPL®) nas diluições testes (1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:6000; 1:8000; 1:12000; 1:16.000) em PBS-T, as placas foram novamente lavadas para receber 100 µL da solução reveladora, KPL SureBlue™ TMB

Microwell Peroxidase Substrate (SERACARE™ -3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidinaperoxidase substrate) por poço. Nesta etapa, a microplaca foi mantida ao abrigo da luz por 5 minutos. Posteriormente, a reação foi bloqueada com 100 µL de KPL TMB Stop Solution (SERACARE™) e a intensidade da cor da reação foi determinada por absorvância em leitor de microplacas (Epoch), com comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.1.7 Análise Estatística

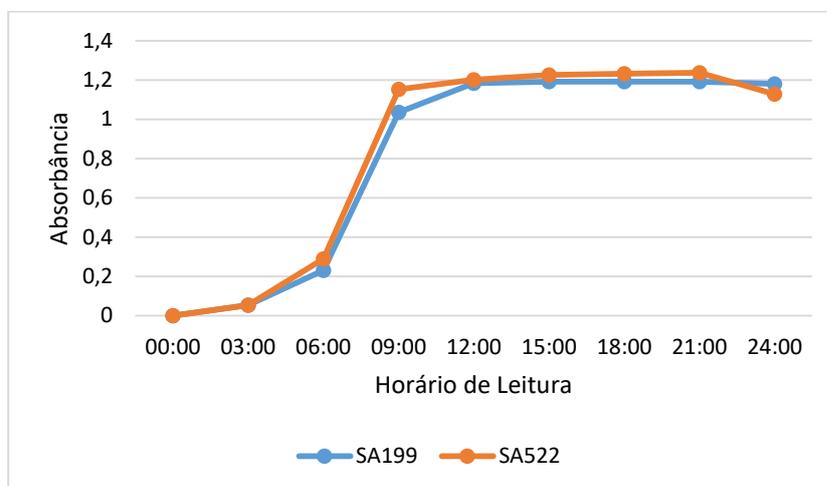
Os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados estatisticamente. As curvas de crescimento dos isolados foram analisadas pelo Software R, Pacote Vegan. As médias dos títulos obtidos no ELISA para as variáveis GV, GC, grupo positivo e grupo negativo da fazenda infectada por *S. agalactiae* foram comparadas pelo teste T. As comparações entre as variáveis foram feitas pelo teste não paramétrico (teste Tukey), utilizando-se o Software GraphPad Prism. O nível de significância considerado foi de 5% para todas as análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Curva de crescimento

As curvas de crescimento dos isolados SA199 e SA522 foram semelhantes (Gráfico 1). Eles mostraram uma fase de latência de até 3 h e uma fase exponencial de até 9 h de crescimento. O isolado SA522 apresentou a maior taxa de crescimento, em relação a SA199. Às 21 horas de incubação, observou-se que o isolado SA522 apresentou o maior rendimento de biomassa ( $2,67 \times 10^{11}$  UFC mL<sup>-1</sup>) em relação ao SA199, que apresentou concentração em torno de  $1,02 \times 10^{11}$  UFC mL<sup>-1</sup>. Não foram encontradas diferenças significativas ( $p=0,4555$ ) entre as fases e tempos de crescimento dos dois isolados.

Gráfico 1 – Curva de crescimento de isolados de *Streptococcus agalactiae* SA199 e SA522, cultivados em Caldo BHI suplementado com soro bovino a 7% em estufa 37°C por 24 h.



Fonte: Do Autor, 2018.

Embora tenha sido observado que ambos os isolados entraram na fase estacionária após 9 horas de cultivo, observou-se que o maior rendimento de massa de ambas as culturas ocorreu às 48 horas de cultivo, ocasião em que as mesmas foram inativadas para a produção da bacterina. A utilização de culturas na fase log de crescimento é fundamental em ensaios de infecção experimental e para a avaliação da expressão de fatores de virulência. Segundo Sitkiewicz & Musser (2009) quase 50% de todas as transcrições de *S. agalactiae* tiveram padrões semelhantes de expressão e atingiram seus picos na fase log de crescimento. Corroborando com o presente estudo, Pellegrino et al. (2018), Banno et al. (2017), Pérez-Pascual et al. (2015) em camundongos, Liu et al. (2014), Tan et al. (2012) em peixes, inocularam isolados de *S. agalactiae* na fase exponencial de crescimento e tiveram uma resposta imune satisfatória.

As bactérias empregam vários mecanismos para controlar a expressão gênica e reagir ao ambiente de constante mudança. Segundo Johri et al. (2007), o crescimento bacteriano em meio laboratorial rico é um processo dinâmico no qual as bactérias utilizam nutrientes do simples ao complexo e alteram as propriedades físicas do meio, como pH, e suprimem a expressão de fatores de virulência para invasão e colonização do hospedeiro, durante o processo. Como demonstrado no estudo, foi utilizado meio de cultura em Caldo BHI (HIMEDIA®) suplementado com 7% soro bovino para a melhor obtenção de massa bacteriana dos isolados.

## 5.2 Padronização ELISA

Dentre as diluições de anticorpo secundário testadas, a diluição de 1:16.000 foi estabelecida como a ideal, pois a que apresentou *background* menor. Desse modo foi definida a menor inespecificidade para o ELISA indireto.

Na padronização do teste, considerou-se a presença de reações inespecíficas, testando a mesma amostra de soro na presença e na ausência do antígeno simultaneamente na mesma placa. O melhor teste de rendimento de proteínas totais foi pela sonicação mecânica, que resultou nas concentrações de 293,2 µg/mL e 242,1 µg/mL para os isolados SA199 e SA522, respectivamente. Os antígenos assim obtidos foram diluídos na sua dose de reatividade ótima, correspondente à 8,52µL/mL do isolado SA199 e 10,32µL/mL do isolado SA522 para o volume de 0,5µL/well.

A diluição ótima do soro foi determinada pela diferença entre as densidades ópticas obtidas nas leituras dos soros controle e vacinados. Aquela que apresentou maior diferença nas diversas concentrações de antígeno foi escolhida como diluição do soro (PINHEIRO, 2001). A partir daí, foi determinado o ponto de corte do ELISA indireto. A melhor diluição do soro foi 1:400.

O ELISA indireto desenvolvido se mostrou eficiente para a quantificação de anticorpos anti-*S. agalactiae* em bovinos vacinados, pois apresentou boa reprodutividade, especificidade e sensibilidade. No entanto, o teste padronizado não demonstrou poder ser utilizado com segurança para a detecção de *S. agalactiae* em estudos epidemiológicos e para a vigilância da mastite bovina causada por *S. agalactiae*, tendo em vista a ausência de IgG sérica contra *S. agalactiae* nos animais naturalmente infectados.

### 5.3 Produção da bacterina e análises sorológicas

A vacinação de bovinos contra a mastite tem como finalidade o aumento na capacidade de resposta imune da vaca contra um determinado agente patogênico. Os programas de vacinação podem ser usados para aumentar a resistência da vaca contra um agente específico, pois, após a imunização, ocorre migração mais rápida de neutrófilos para o local da infecção e a estimulação da produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B (MESQUITA-JÚNIOR et al., 2010).

A forma mais simples de vacina é aquela produzida a partir de microrganismos íntegros (vacinas atenuadas ou inativadas) ou lisados, produzidos a partir de bactérias, com ou sem adjuvantes. Nas vacinas inativadas, as bactérias perdem a patogenicidade, mas mantêm seus antígenos, os quais estimulam principalmente a resposta imune humoral (TOMAZI, 2017). Por outro lado, a utilização de vacinas que contém microrganismos patogênicos inativados ou atenuados implica na utilização de antígenos brutos, protetores e não protetores. Este tipo de imunização tem a potencial desvantagem de desviar ou diluir a resposta imune protetora contra antígenos não específicos, além de não serem totalmente seguras (SANTOS, 2012). Calzas et al. (2017) relataram que as bacterinas confeccionadas por células inteiras inativadas usadas fornecem proteção limitada. Além disso, apesar do fato de as vacinas baseadas em proteínas conferirem defesa potente em testes clínicos, elas geralmente não fornecem proteção de cobertura ampla (HEATH, 2005).

A eficácia da vacina inativada pode ser melhorada com uso de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (LINDBLAD, 2004). O benefício da adição de um adjuvante à vacina surge de sua interação com a resposta imune inata. Ao modular a resposta imune inata, essa característica dos adjuvantes torna-se particularmente importante para vacinas contendo antígenos purificados, que apresentam baixa capacidade imunoestimulatória (LEROUX-ROELS, 2010). Como a resposta imune ao antígeno na presença de adjuvante é aumentada, uma quantidade menor de antígeno pode ser necessária para induzir uma resposta imune efetiva. Esse fenômeno é conhecido como "*antigen sparing*" e permite a produção de mais doses de vacina, aumentando o rendimento industrial (SCHIJNS, 2011).

A indução da produção de anticorpos é um dos principais mecanismos da imunidade adaptativa contra infecções por patógenos extracelulares. Os agentes infecciosos ou seus antígenos são apresentados aos linfócitos B, por meio de células apresentadoras de antígenos ou diretamente (antígenos timo independentes) e, dessa forma, há proliferação clonal e a produção de anticorpos específicos que poderão exercer as seguintes funções: (1)

neutralização do agente infeccioso; (2) opsonização do patógeno e fagocitose; (3) ativação da via clássica do complemento (opsonização, fagocitose, lise celular e amplificação da inflamação) (ABBAS, 2008).

Reações adversas, principalmente no local da injeção, tem sido consistentemente observada para vacinas com adjuvantes em comparação àquelas que não são adjuvadas (COFFMAN, 2010). No entanto, esses sintomas locais são, geralmente, de intensidade leve a moderada, de curta duração e não afetam a conformidade dos esquemas de dosagem (CAMPOS et al., 2013). Esse fenômeno não foi observado na pesquisa em questão, pois nenhum dos camundongos utilizados no teste de inocuidade e nem os bovinos após a vacinação apresentaram reações locais ou sistêmicas, imediatas ou mediatas e atribuíveis à presença da vacina no tecido subcutâneo, a não ser discreto e passageiro aumento de volume no local da aplicação, atribuído ao trauma próprio do procedimento de injeção.

A dose vacinal do experimento foi ajustada de modo a conter  $1,0 \times 10^9$  bactérias/mL de cada isolado, em dose vacinal de 5 mL e não foram observadas reações locais ou sistêmicas nos animais. Corroborando com Alekish (2018), que relatou a ausência de reação vacinal em ovelhas, com dose de 3 mL por via subcutânea contendo  $6 \times 10^9$  UFC/mL da vacina Mastivac (Ovejero Laboratories, Espanha). Ademais, esse estudo divergiu dos resultados de Athan (2007) e Butt (2006), que utilizaram a dose vacinal de  $5 \times 10^{10}$  UFC's mL e relataram um leve edema local e aumento da pressão e temperatura retal nos coelhos vacinados.

Segundo Bugno et al. (2018), o teste de esterilidade é de suma relevância na garantia da qualidade e segurança da vacina. Esse estudo reitera a importância da pesquisa em questão, onde os resultados do teste de esterilidade mostraram que a vacina preparada apresentou-se livre de contaminantes externos (bactérias aeróbias e anaeróbias e fungos) e de microorganismos viáveis. No presente estudo não foram observadas reações adversas gerais à vacina aplicada nas nos camundongos ou nas vacas vacinadas durante todo o período experimental, indicando a segurança da vacina preparada.

A bactéria experimental produzida demonstrou ser antigênica, induzindo a formação de anticorpos nos animais vacinados. A resposta de anticorpos séricos (IgG) anti-*S. agalactiae* da vacina, em termos de títulos médios geométricos, foi significativamente maior no grupo vacinado em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figuras 2 e 3). Os resultados do grupo vacinado foram comparados com os do controle pelo teste T e notou-se que a média dos títulos de IgG do grupo vacinado em D30 aumentou significativamente em relação ao grupo controle. Também se diferenciaram estatisticamente os títulos observados em D0 e D30

para o grupo vacinado ( $p=0,0006$ ). O grupo controle não apresentou diferença significativa quanto aos títulos verificados em D0 em relação ao D30 ( $p=0,1697$ ).

Corroborando com os resultados do presente estudo, Ahmar (2008) descreveu os resultados obtidos com a aplicação de uma vacina bivalente contra a mastite causada por *S. aureus* e *S. agalactiae* em coelhos, tendo verificado que os títulos de anticorpos IgG anti-estreptocócicos e anti-estafilocócicos específicos do grupo vacinado aumentaram significativamente em comparação com o grupo controle. Em estudos prévios (QUDRATULLAH, 2017; ATHAN, 2007; BUTT, 2006; ABUBAKAR et al., 2006) também foram verificadas diferenças entre o grupo vacinado contra *S. agalactiae* e o grupo controle quanto aos níveis de anticorpos séricos (IgG) induzidos pela vacinação.

Quando comparados os títulos de anticorpos séricos (IgG) anti-*S. agalactiae* dos animais infectados versus não infectados da fazenda positiva para *S. agalactiae*, com os títulos dos soros sanguíneos dos animais do grupo vacinado em D0 não se verificaram diferenças estatísticas entre os níveis ( $p>0,05$ ), conforme demonstrado na Figura 3. No entanto, pode ser observado pelas figuras 2 e 3 que alguns animais que não tiveram exposição ao antígeno - animais negativos da fazenda infectada, animais do grupo controle em D0 e D30 e animais do grupo vacinado - apresentaram títulos de IgG semelhantes. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de se ter utilizado um antígeno bruto para a padronização do ELISA e pelo fato de os animais utilizados neste estudo poderem estar previamente sensibilizados por outros agentes infecciosos que poderiam induzir a ocorrência de reações inespecíficas.

Neste estudo, foi utilizado antígeno bruto, obtido por meio da sonicação mecânica de isolados de *S. agalactiae*, deste modo, o ELISA desenvolvido não tinha como alvo anticorpos específicos para uma ou mais proteínas presente em *S. agalactiae*, mas sim para o extrato protéico total dos isolados. Diante disto, não se sabe quais proteínas foram responsáveis pela indução da produção de anticorpos (IgG) anti-*S. agalactiae* nos animais vacinados ou nos naturalmente infectados.

Estudos demonstram que as vacinas contra mastite apresentam resultados variáveis, pois a mastite é causada por uma grande diversidade de microrganismos, os quais podem apresentar variações genéticas mesmo dentro da mesma espécie (ZUBAIR et al., 2013; SANTOS & TOMAZI, 2012). Por outro lado, Ferretti et al. (2001) compararam o genoma de *S. agalactiae* com os genomas de outros dois estreptococos patogênicos, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*, e mostraram que a maioria das proteínas preditas de *S. agalactiae* tem homologia em, ao menos, uma das outras duas espécies. Além disso, a ordem

cromossômica dos genes é altamente conservada entre *S. agalactiae* e *S. pyogenes*, ressaltando a relação entre estas duas espécies (LINDAHL et al., 2005).

O fato de que proteínas relacionadas são encontradas em vários outros patógenos importantes que podem estar envolvidos em processos infecciosos em bovinos sugere que os mecanismos patogênicos e antígenos presentes em *S. agalactiae* podem ser compartilhados por várias espécies bacterianas, justificando os resultados encontrados na sorologia para os grupos experimentais utilizados no presente estudo. No presente estudo, se observou que uma parcela significativa dos animais utilizados como controle e vacinados e mesmo animais não infectados por *S. agalactiae* oriundos da fazenda infectada pelo referido agente apresentaram cultura positiva, especialmente para *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN).

Corroborando este argumento, Obukhanych (2006) demonstrou que houve proteção cruzada devido a antígenos expressos por diferentes espécies bacterianas. Ele relacionou anticorpos contra *Streptococcus pneumoniae* tipo 14 com estruturas presentes em GBS tipo III. Em conjunto, Ellis (2010) relatou que a imunidade protetora contra a infecção experimental pelo GBS tipo III pode ser desencadeada não apenas pela imunização com antígenos GBS, como foi realizado nesse estudo, mas também pela imunização com a cápsula de *S. pneumoniae* tipo 14 ou com a proteína R28 de *Streptococcus* do Grupo A (GAS).

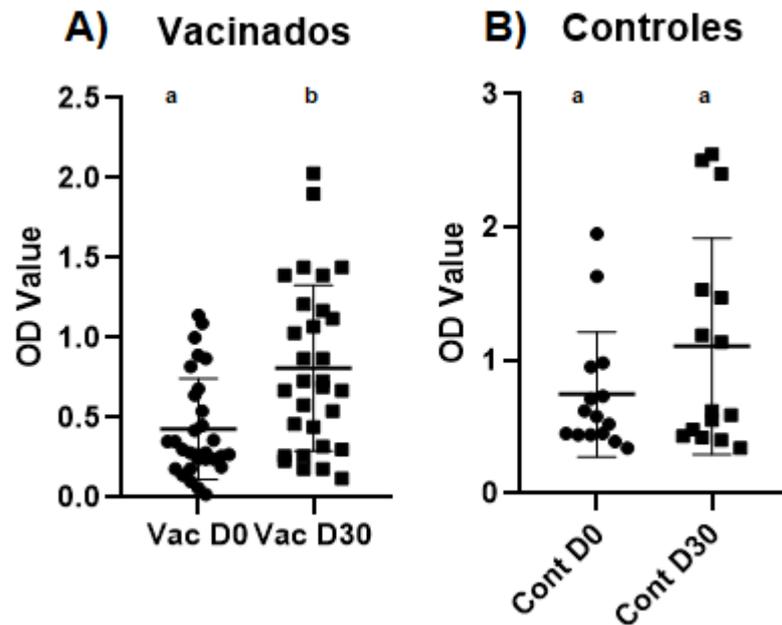
Lindahl et al. (2005) realizaram um estudo com as proteínas da família Alp de *S. agalactiae* e identificaram que algumas bactérias expressavam genes de proteínas relacionadas ao Alp, como o gene *Esp* de *Enterococcus faecalis* (TOLEDO-ARANA et al., 2001) e a proteína *Bap* de 9239-kDa de algumas cepas de *S. aureus* causadoras de mastite bovina. Estes genes encontrados são implicados na formação de biofilme, sugerindo que essa poderia ser uma propriedade geral de proteínas relacionadas com Alp.

Não se observaram diferenças significativas nos níveis de anticorpos séricos IgG anti-*S. agalactiae* entre os animais infectados e não infectados oriundos da fazenda naturalmente infectada pelo *S. agalactiae* ( $p=0,9655$ ). Estes resultados sugerem que a infecção da glândula mamária em bovinos por *S. agalactiae* não induz a produção de IgG sérica. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que na mastite bovina, este agente causa infecções restritas à glândula mamária (SILVA, 2015; ALNAKIP et al., 2014), diferentemente do que ocorre nas infecções em seres humanos e nos peixes (CARVALHO-CASTRO et al., 2017; GODOY et al., 2011), espécies nas quais o referido agente causa infecções sistêmicas, o que justificando a presença de anticorpos séricos. Estas diferenças em termos de patogênese para os diferentes hospedeiros podem ser justificadas pelo fato de que *S. agalactiae* possui um grande número de genes associados aos elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos, transposons e

elementos de inserção, possivelmente adquiridos por transmissão horizontal de outras espécies bacterianas. Acredita-se que esses genes estão associados, principalmente, a adaptação, capacidade de colonizar e causar doença em seus diferentes nichos e hospedeiros (CARVALHO-CASTRO et al., 2017; ZUBAIR et al., 2013).

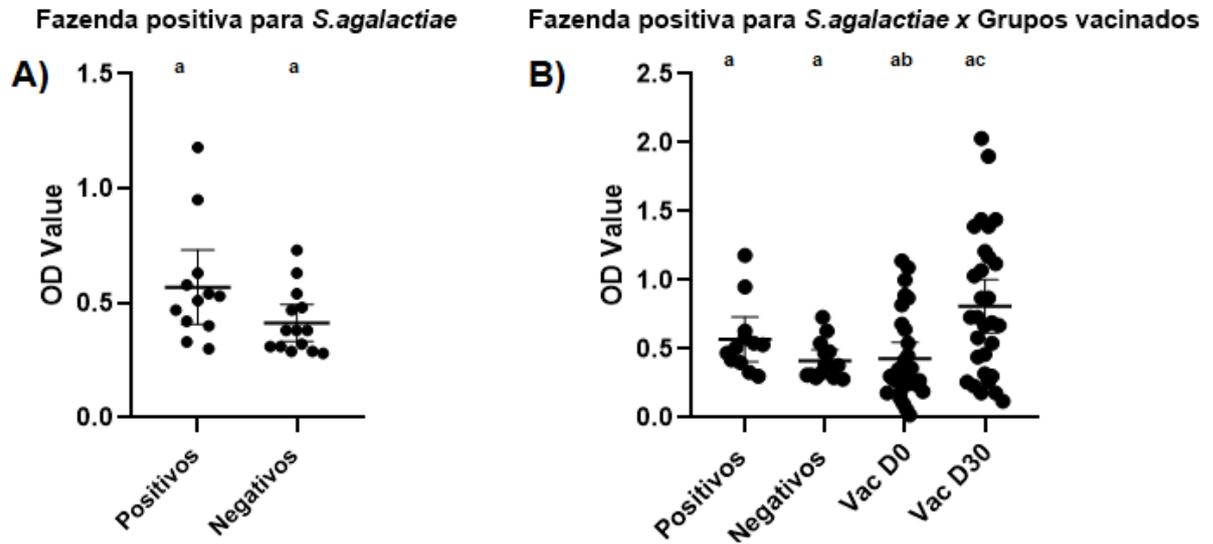
O presente estudo demonstrou que a bacterina utilizada foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* em animais vacinados. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a proteção efetiva desta bacterina em rebanhos infectados por *S. agalactiae* e para a caracterização de antígenos protetores, o que irá gerar informações de interesse geral para o entendimento da patogênese de *S. agalactiae* e para o desenvolvimento de vacinas efetivas.

Figura 2 – Níveis de anticorpos anti-*S. agalactiae* em A) soros de vacas vacinadas, B) soros de vacas controle, nos momentos D0 e D30 do período experimental.



Legenda: Comparação de títulos séricos de anticorpos (IgG) anti-*S. agalactiae* A) grupo vacinado B) grupo controle. Diferenças nos níveis de anticorpos dos grupos foram utilizados para calcular os valores de p pelo teste T. Letras iguais não apresentaram diferença significativa e letras diferentes apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Figura 3 – Níveis de anticorpos séricos anti-*S. agalactiae* de uma fazenda positiva e uma fazenda negativa para *Streptococcus agalactiae*.



Legenda: Comparação entre níveis de anticorpos (IgG) anti-*S. agalactiae* pelo soro de animais positivos e negativos pela infecção por *S. agalactiae*. A) Soro de animais de uma fazenda com histórico da doença e cultura microbiológica positiva para *S. agalactiae*. B) Soro de animais da fazenda positiva e soro dos grupos vacinados. Diferenças nos níveis de anticorpos dos grupos foram utilizados para calcular os valores de p pelo teste T e teste Tukey, na figura A e B, respectivamente. Letras iguais não apresentaram diferença significativa. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste Tukey, considerando o nível de 5% de significância.

## 6 CONCLUSÕES

A vacina desenvolvida foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* em vacas primíparas.

O teste de ELISA desenvolvido se mostrou eficiente para detecção de anticorpos IgG anti-*S. agalactiae* em bovinos vacinados.

Não foi possível diferenciar animais infectados de animais não infectados por *S. agalactiae* por meio do ELISA desenvolvido, sugerindo que a mastite causada por este agente não induz a produção de IgG sérica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. Sexta Edição. Rio de Janeiro. Elsevier. 2008
- ABUBAKAR, M.; MUHAMMAD,G.; IBRAHIM, K. Primary and secondary immune response to formalin inactivated *Streptococcus agalactiae* isolates in rabbits, **Pakistan Vet J**, ed.26, v3, p.115-7. 2006.
- AHMAD, T.; MUHAMMAD, G. Evaluation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* aluminium hydroxide adjuvanted mastitis vaccine in rabbits. **Pak. J. Agri. Sci.** V 45(2). 2008.
- ALEKISH, M.O. et al. Bacteriological cure rate and changes in milk composition in mastitis vaccinated ewes affected with subclinical mastitis. **Veterinary World**, 11(2): 125-129. 2018.
- ALNAKIP, M.E. et al. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **Journal of Veterinary Medicine**. V.2014, p.31. 2014
- ASSIS, G.B.N. et al. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Front. Microbiol.** 8:1492. 2017.
- BANNO, H. et al. Analysis of multidrug resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small, less hemolytic colonies. **PLoS ONE** .2017.
- BAROCCHI, M.A.; RAPPUOLI, R. Delivering vaccines to the people who need them most. **Phil. Trans. R. Soc. B** 370: 20140150. 2015
- BARONY, G.M. et al. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Nature. Scientific Reports**. v7: 13538. 2017.
- BI, Y. et al. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. **PLoS ONE**, v.11(5): e0155621. 2016.
- BRADE, L., HENSEN, S., BRADE, R. Evaluation of a LPS-based glycoconjugate vaccine against bovine *Escherichia coli* mastitis: Formation of LPS Abs in cows after immunization with *E. coli* core oligosaccharides conjugated to hemocyanine. **Innate Immunity**, v.19 (4), 368-377, 2012.
- BRADFORD, M.M.A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254. 1976.
- BRADLEY, A. J. **Bovine mastitis**: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, London, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.

- BRADLEY, A.J., BREEN, J.E., PAYNE, B., WHITE, V.; GREEN, M.J. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. **J. Dairy Sci.**, 98: 1706-1720. 2015.
- BUGNO, A. et al. Performance Survey and Comparison Between Rapid Sterility Testing Method and Pharmacopoeia Sterility Test. **Journal of Pharmaceutical Innovation**. v.13. p27–35. 2018.
- BUTT, A.A. **Evaluation of four adjuvanted trivalente vaccines for the control of mastitis in dairy buffaloes and cows**. Ph.D. Thesis, Deptt. of Clinical Medicine and Surgery, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. 2006.
- CALZAS, C. et al. Evaluation of the immunomodulatory properties of Streptococcus suis and Group B Streptococcus capsular polysaccharides on the humoral response. **Pathogens**, v.6, 16; 2017.
- CALZOLARI, A. et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. **J Dairy Sci**; v.80, p.854–8. 1997.
- CAMPOS, A.D. et al. Efficiency of inactive vaccines against contagious agalactia in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.5, p.1394-1402, 2013.
- CARVALHO-CASTRO, G.A. **Caracterização molecular de Streptococcus agalactiae isolados de mastite em bovinos no brasil**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, 2013.
- CARVALHO-CASTRO, G.A.; SILVA, J.R.; PAIVA, L.V.; CUSTODIO, D.A.C.; MOREIRA, R.O.; MIAN, G.F.; PRADO, I.A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; COSTA, G.M. Molecular epidemiology of Streptococcus agalactiae isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Brazilian Journal of Microbiology**. 48. 551-559. 2017.
- COFFMAN, R.L.; SHER, A.; SEDER, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**. v..33. p492-503; 2010.
- CONTRERAS, G.A.; SORDILLO, L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comp. Immunol. Microbiol.** 34:281–289. 2011.
- COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123 p. Tese (Doutorado em Veterinária – Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- COSTA, G.M. et al. Population diversity of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Res. Vet. Science**, London, v.93, p.733-735, 2012.
- CROWTHER, J.R. The ELISA Guidebook. Ed. 2nd ed. New York: **Humana Press, Methods in Molecular Biology Series**. V.516. 2009.
- DA SILVA, F.T.; DI PASQUALE, A.; YARZABAL, J.P.; GARÇON, N. Safety assessment of adjuvanted vaccines: Methodological considerations. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. Ed.11; v.7; p.1814--1824; 2015.

DELANNOY, C.M.J. et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. **BMC Microbiology** .13:41. 2013.

DELLAGOSTIN, O.A.; FELIX, S.R.; JORGE, S. Recombinant veterinary vaccines. In: Soccol VT, Pandey A, Resende R, editors. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Human and Animal Health Applications**. p. 439–58. 2017

DICIO. **Dicionário Online de Português, definições e significados de mais de 400 mil palavras**. 2018. Acesso em 17/09/18. Disponível em: <https://www.dicio.com.br/vacina/>

DOWN, P. M., BRADLEY, A. J., BREEN, J. E., & GREEN, M. J. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.145, p.91–99. 2017

DUARTE, C.M.; FREITAS, P.P.; BEXIGA, R.; Technological advances in bovine mastitis diagnosis: na overview. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.27(6); p.665–672. 2015.

ELLIS, T.N.; KUEHN, M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiol Mol Biol Rev**. v.74; p.81–94. 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produção de leite**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.V-BrF> Acessado em: 12 de outubro de 2016.

FERRETTI, J. et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V.98; p.4658-4663. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The agricultural production domain**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> . Acesso em: 5 fev. 2018.

FOUNOU, L.L.; FOUNOU, R.C.; ESSACK, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. **Front Microbiol**. v.7; p.1881. 2016

FRAGKOU, I. A.; BOSCOS, C. M.; FTHENAKIS, G. C. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. **Small Ruminant Research**, 118(1-3), 86–92. 2014.

FRIDKIN, S.K.; CLEVELAND, A.A.; SEE, I.; LYNFIELD, R. Emerging infections program as surveillance for antimicrobial drug resistance. **Emerg Infect Dis**. 21(9):1578–81. 2015.

GODOY, D. T. de. **Relações clonais, genes de virulência e patogenicidade dos *Streptococcus agalactiae* isolados de peixes**. 2011. 78 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GOLDER, H. M.; HODGE, A.; LEAN, I. J. Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. **Journal of Dairy Science**, 99(9), 7370–7380. 2016.

GUERREIRO, O. et al. Molecular screening of ovine mastitis in different breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 752–760, 2013.

HAO, H.; CHENG, G.; IQBAL, Z.; AI, X.; HUSSAIN, H.I.; HUANG, L. et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Front Microbiol.** v.5; p.288. 2014.

HEATH, P.T.; FELDMAN, R.G. Vaccination against group B Streptococcus. **Expert Rev. Vaccines.** v.4, p.207–218. 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Carta Leite – **A Produção de leite caiu em 2018**. Foi a primeira queda desde o início do levantamento. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=o-que-e>. Acesso em 12 de setembro de 2018.

ISMAIL, Z.B. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application, **Veterinary World**, 10(9): 1057-1062. 2017.

JOHRI, A.K.; MARGARIT, I.; BROENSTRUP, M.; BRETTONI, C.; HUA, L. et al. Transcriptional and proteomic profiles of group B Streptococcus type V reveal potential adherence proteins associated with high-level invasion. **Infect Immun**, 75:1473-1483. 2007

KACZOREK, E.; MALACZEWSKA, J.; WÓJCIK, R.; SIWICKI, A.K. Biofilm production and other virulence factors in Streptococcus spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. **BMC Veterinary Research** . 13:398. 2017

KEEFE, G. Update on Control of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae for management of mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 203–216, July 2012.

KOBAYASHI, M.; VEKEMANS, J.; BAKER, C.J. et al. Group B Streptococcus vaccine development: present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries. **F1000Res.** V.5; p.2355. 2016.

LAUNAY, O.; DUVAL, X.; FITOUSSI, S.; JILG, W.; KERDPANICH, A. et al. Extended antigen sparing potential of AS03-adjuvanted pandemic H1N1 vaccines in children, and immunological equivalence of two formulations of AS03-adjuvanted H1N1 vaccines: results from two randomised trials. **BMC Infect Dis.** V.13; p.435. 2013.

LEE, B.Y.; MUELLER, L.E.; TILCHIN, C.G. A Systems Approach to Vaccine Decision Making. **Vaccine.** January 20; 35(Suppl 1): A36–A42. 2017.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. **Vaccine** 28 3:C25-36; 2010;

LINDAHL, G.; LHAMMAR-CARLEMALM, M.S.; ARESCHOUG, T. Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. **Clinical Microbiology Reviews.** Vol. 18, No. 1. p. 102–127. 2005.

LINDBLAD, E. Aluminium compounds for use in vaccines. **Immunology and Cell Biology.** v.82, p.497-505. 2004.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES. **Genus Streptococcus**. 2018. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em: 23 de agosto de 2018.

LIU, G., YIN, J., BARKEMA, H. W., CHEN, L., SHAHID, M., SZENCI, O., HAN, B. Development of a single-dose recombinant CAMP factor entrapping poly(lactide-co-glycolide) microspheres-based vaccine against *Streptococcus agalactiae*. **Vaccine**, 35(9), 1246–1253. 2017.

LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

LYHS, U.; KULKAS, L.; KATHOLM, J.; WALLER, K.P.; SAHA, K.; TOMUSK, R.J.; ZADOKS, R.N. *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, Northern Europe. **Emerg Infect Dis** 22:2097–2103. 2016

MAGAS, V. et al. Efficiency evaluation of a bivalente vaccine in the prophylaxis of mastitis in cows. **Acta Veterinaria (Beograd)**. Vol 63, N5-6, pag 525-536. 2013.

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>

MARGARIT, I. et al. Preventing Bacterial Infections with Pilus-Based Vaccines: the Group B *Streptococcus* Paradigm. **Journal of Infectious Diseases**, 199(1), 108–115. 2009.

MARRACK, P.; MCKEE, A.S.; MUNKS, M.W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat. Rev. Immunol.** 9, 287–293. 2009.

MESQUITA, A.A. **Impacto da Mastite Bovina por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae***. Tese. Doutorado. Universidade Federal de Lavras, p.73. 2017.

MESQUITA-JÚNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**; 50(5):552-80. 2010.

MOTA, E.F.; LIMA, M.G.S.; MELO, D.F. **Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas**. *Ciência Animal*, 16(2):79-88, 2006.

MOUDGIL, P.; BEDI, J.S.; MOUDGIL, A.D.; GILL, J.P.S.; AULAKH, R.S. Emerging issue of antibiotic resistance from food producing animals in India: perspective and legal framework. **Food Rev Int**. 2017.

MSD SAÚDE ANIMAL. **AQUAVAC® STREP** Sa: resumo da bula. 2012. Disponível em: [http://www.msd-saudeanimal.com.br/products/Copy\\_of\\_AQUAVAC\\_/020\\_Resumo\\_da\\_Bula.aspx](http://www.msd-saudeanimal.com.br/products/Copy_of_AQUAVAC_/020_Resumo_da_Bula.aspx)> Acesso em: 2 mar. 2018.

NMC. Current concepts of bovine mastitis. Current concepts of bovine mastitis. **Anais...Madison**: 1996. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000106&pid=S0031-1049200200140000100028&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000106&pid=S0031-1049200200140000100028&lng=es)>

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). 2004. **Recommended Mastitis Control Program**. Available from: [www.nmconline.org/docs/NMCchecklistna.pdf](http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistna.pdf) Accessed Setembro, 2018.

OBUKHANYCH, T.V.; NUSSENZWEIG, M.C. T-independent type II immune responses generate memory B cells. **J Exp Med**. 2006; 203:305–310.

OLATOYE, O.; AMOSUN, A.; OGBU, U.; OKUNLADE, Y. Bulk tank somatic cell count and associated microbial quality of milk from selected dairy cattle herds in Oyo State, Nigeria. **Italian Journal of Food Safety**; v.7:7130. 2018

OLIVEIRA, A.J.; MORAES, J.F.; FERREIRA, I.C.; MONTEIRO, C.P.; CARVALHO, A.D.F. Mastite clínica e subclínica em pequenas propriedades leiteiras no município de Araguari – MG. **Embrapa Hortaliças**. N. 19 (1), p. 7-13. Uberlândia: 2013b.

OLIVEIRA, J.S.S. et al. Reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase and PI3K/Akt pathways contribute to invasion of *Streptococcus agalactiae* in human endothelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 113(6): e140421, 2018.

OLIVEIRA, L.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**. 96(12):7538–49. Epub 10/15. 2013.

PANG, M.; SUN, L.; HE, T.; BAO, H.; ZHANG, L.; ZHOU, Y. et al. Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. **Veterinary Research**. 48-65. 2017.

PELLEGRINO, M.S et al. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**. Springer. p.1-11. 2018.

PÉREZ-PASCUAL, D. et. al. RovS and Its associated signaling peptide form a cell-to-cell communication system required for *Streptococcus agalactiae* pathogenesis. **American Society for Microbiology**. V.6 (1). p.1-12. 2015.

PIMENTEL, B.A.; MARTINS, C.A.; MENDONÇA, J.C.; MIRANDA, P.S.; SANCHES, G.F.; MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. *Streptococcus agalactiae* infection in cancer patients: a five-year study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 35(6): 927-33. 2016.

PINHEIRO, R.R. **Vírus de Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (Elisa e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001.

QUADRATULLAHA, G.; MUHAMMADA, M.; SAQIBA, M.; QAMAR BILAL, B. Isolation, characterization, virulence and immunogenicity testing of field isolates of *Pasteurella*

multocida, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus agalactiae* in laboratory settings. **Acta Tropica**. 172 . 70–74. 2017.

RAINARD, P.; SARRADIN, P.; POUTREL, B. Phenotypic variability of X-protein expression by mastitis-causing *Streptococcus agalactiae* of serotype NT/X and opsonic activities of specific antibodies. **Microb Pathog**; 16:359–72. 1994

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. et al. **Bovine protothecal mastitis: a review**. Perspectives in Agriculture, Veterinary Sciences, Nutrition and Natural Resources, v. 1, n. 17, p. 1-7, 2006.

REYES J, CHAFFER M, SANCHEZ J, TORRES G, MACIAS D, JARAMILLO M, et al. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy Science**. 98(8):5294–303. 2015;

RIOS, A.C.; MOUTINHOB, C.G.; PINTO, F.C.; DEL FIOLO, F.S.; JOZALAA, A.; CHAUDA, M.V. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. **Microbiol Res**. 191:51–80. 2016

ROSINI, R.; CAMPISI, E.; DE CHIARA, M.; TETTELIN, H.; RINAUDO, D.; TONIOLO, C. et al. Genomic Analysis Reveals the Molecular Basis for Capsule Loss in the Group B *Streptococcus* Population. **PLoS ONE** 10(5): e0125985. 2015.

SANTOS, M. V. DOS. Mastite pode ser controlada com medidas preventivas e baratas. **MILKPOINT**, p. 1–2, 2016.

SANTOS, M.V.; TOMAZI, T. Vacinas e vacinações: uso de vacinas como ferramenta para controle da mastite bovina. **LEITE INTEGRAL**, Belo Horizonte, MG: Lastro, 06, n.38, p. 20-27, abr. 2012.

SANTOS, M.V.; TOMAZI, T. Vacinas e vacinações: uso de vacinas como ferramenta para controle da mastite bovina. Belo Horizonte: **Leite integral**, Abr., n.38, p. 20-27. 2012.

SAYED, M.L.; SHELL, W.S.; HANAN, A.A.; HANAN, M.I.; NASR, E.A.; ALI, A.M. Efficacy of a locally prepared bovine mastitis vaccine. **Benha Vet Med J** . 29 ( 2 ): 309-18. 2015.

SCHIJNS, V.E.J.C.; LAVELLE, E.C. Trends in vaccine adjuvants. **Expert Rev Vaccines**; 10:539-50; 2011

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B.P.; GULHANE, R.D. et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Front. Vet. Sci**. 4:237. 2018. doi: 10.3389/fvets.2017.00237

SILVA, J. R. **Avaliação da virulência e susceptibilidade a antimicrobianos em *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina de rebanhos brasileiros**. 2015. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SITKIEWICZ, I.; MUSSER, J.M. Analysis of growth-phase regulated genes in *Streptococcus agalactiae* by global transcript profiling. **BMC Microbiology**. 9:32. 2009

TAN, C.K. et al. Genome-Wide Mapping of Cystitis Due to *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in Mice Identifies a Unique Bladder Transcriptome That Signifies Pathogen-Specific Antimicrobial Defense against Urinary Tract Infection. **Journals Infection and Immunity**. v 80(9). p.3145-3160. 2012.

THOMAS, V.; JONG, A.; MOYAERT, H.; SIMJEE, S.; GARCH, F.E.; MORRISSEY, I. et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe. **Vet Path result. Int J Antimicrob Agents**. 46:13–20, 2015.

TIWARI, J.; BABRA, C.; TIWARI, H.K.; WILLIAMS, V.; DE WET, S.; GIBSON, J. et al. Tendências em estratégias terapêuticas e de prevenção para o manejo da mastite bovina: uma visão geral. **J Vaccines Vaccin**. 4:2. 2013.

TOLEDO-ARANA, A., J. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol**. 67:4538–4545. 2001.

TOMAZI T. **Etiological and molecular profile of pathogens causing clinical mastitis, and antimicrobial use in dairy herds**. Doctoral dissertation, University of São Paulo. 2017.

TOMAZI, T.; DE SOUZA FILHO, A.F.; HEINEMANN, M.B.; SANTOS, M.V. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. **PLoS ONE** 13(6): e0199561. 2018.

TOMAZI, T.; FREITAS, R.L.; MODENA, A.O.; FERREIRA, G.C.; GONÇALVES, J.L.; SANTOS, M.V. Prevalence of pathogens and severity of clinical mastitis in dairy herds of southeast Brazil. **54th National Mastitis Council**. 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 894p. 2005.

VAN HOOIJDONK, T.; HETTINGA, K. Dairy in a sustainable diet: a question of balance. **Nutr Rev** 73:48-54. 2015.

VEIGA, V.M.O. Diagnóstico da mastite bovina. Juiz de Fora: EMBRAPA-NPGLADT, (Circular Técnica n. 51). 24p. 1998.

ZUBAIR, S. et al. Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain 09mas018883, Isolated from a Swedish Cow. **Genome Announcements**, 1(4). 2013.