

DETECÇÃO DE SOROALBUMINAS E IMUNOGLOBULINAS NO LEITE BOVINO COMO INDICADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA¹

EVALUATION OF SERUM ALBUMIN AND IMMUNOGLOBULINS IN BOVINE MILK AS AN INDICATOR OF SUBCLINICAL MASTITIS

Jackson Barros do Amaral² Terezinha Padilha Charles³
Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito⁴

RESUMO

Com o objetivo de verificar a utilidade da detecção de soroalbumina (BSA) e imunoglobulinas (Ig) no leite como diagnóstico da mastite subclínica, avaliou-se a relação entre a concentração dessas proteínas, o exame microbiológico e o teste "California Mastitis Test" (CMT). Amostras de leite de 172 quartos mamários previamente examinadas pelo CMT foram colhidas e levadas imediatamente ao laboratório para exames bacteriológicos. Uma alíquota de cada amostra foi congelada a -20°C e posteriormente testada para a presença de BSA e Ig, por meio da técnica de imunodifusão radial simples. Das amostras testadas, 111 apresentaram níveis fisiológicos de BSA (< 0,2mg/ml) e de Ig (< 0,5 mg/ml), 22 apresentaram níveis elevados de ambas proteínas e 39 apresentaram níveis elevados de Ig, mas níveis fisiológicos de BSA. Concentrações de BSA e Ig acima dos limites fisiológicos foram observadas mais frequentemente em amostras onde o CMT apresentou reação de maior severidade (+++) e naquelas onde foram isoladas *Streptococcus* spp.

e *Staphylococcus aureus*. Entre as 88 amostras positivas no exame bacteriológico, níveis de BSA e Ig acima do limite fisiológico foram observados em 10 e 35, respectivamente. Em amostras onde não se isolou bactérias (84 das 172 examinadas), níveis fisiológicos de BSA e Ig foram observados em 72 e 58 delas, respectivamente. A detecção de BSA e Ig nas amostras de leite forneceu informações adicionais sobre o grau de lesão tecidual, mas não pode ser considerada como um indicador sensível para detecção precoce da reação inflamatória.

Palavras-chave: mastite subclínica, imunoglobulinas, soroalbumina, diagnóstico, bovino.

SUMMARY

This work aimed to evaluate the feasibility of milk serum albumin (BSA) and immunoglobulin (Ig) detection for the diagnosis of subclinical mastitis. Bacteriological

¹Parte da tese apresentada pelo primeiro autor como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, março de 1993.

²Médico Veterinário, Instituto de Zootecnia, Estação Experimental de Zootecnia de Andradina, Caixa Postal 67, Timboré, 16900-000 - Andradina, SP.

³Médico Veterinário, MSc., PhD, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), Rodovia MG 133, Km 42, 36155-000 - Coronel Pacheco, MG, bolsista do CNPq.

⁴Farmacêutico-Bioquímico, MSc., PhD, EMBRAPA-CNPGL, autor para correspondência, bolsista do CNPq.

examinations and concentrations of BSA and Ig were determined in 172 milk samples. The samples were also examined by the California Mastitis Test (CMT). Immediately after collection, the samples were taken to the laboratory and bacteriologically examined. An aliquot of each sample was kept at -20°C and later, concentrations of BSA and Ig were determined by radial immunodiffusion. A total of 111 milk samples had physiological levels of BSA (< 0.2 mg/ml) and Ig (< 0.5 mg/ml). Twenty-two samples had higher levels of both proteins and 39 samples had higher levels of Ig and physiological levels of BSA. Concentrations of BSA and Ig above the physiological levels were more frequently observed in quarters samples with severe (+++) CMT reaction and udder infection caused by *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus*. In bacteriologically positive quarters (88 out of 172), increased levels of BSA and Ig were found in 10 and 35 samples, respectively. In the bacteriologically negative quarters (84 out of 172), physiological levels of BSA and Ig were found in 72 and 58 samples, respectively. Although BSA and Ig measurements in milk samples gave further information about udder tissue damage, they can not be used as a sensitive parameter to detect early inflammatory reaction.

Key words: subclinical mastitis, immunoglobulin, bovine serum albumin, diagnosis, bovine.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de métodos de diagnóstico que possam indicar a presença de enfermidades subclínicas ou que possam avaliar a recuperação de animais submetidos a medidas curativas é de utilidade na bovinocultura de leite. Dentre as enfermidades que acometem bovinos de leite adultos, a mastite é uma das doenças que mais se beneficiariam de métodos de diagnósticos com esta capacidade (BRAMLEY, 1992).

Como conseqüência da mastite ocorrem aumento do número de células somáticas e de algumas substâncias, como por exemplo, soroalbuminas e imunoglobulinas (GIESECKE & VILJOEN, 1974; BRAMLEY, 1992). As albuminas e imunoglobulinas estão presentes em quantidades ínfimas na secreção láctea, $< 0,2$ e $< 0,5$ mg/ml, respectivamente (GUIDRY et al., 1983; POUTREL et al., 1983). Quando presentes em níveis acima destes limites fisiológicos, representam um indicador sensível do aumento de permeabilidade capilar, enquanto as imunoglobulinas indicam também resposta específica a microrganismos (GIESECKE & VILJOEN, 1974; CAFFIN et al., 1983; CAFFIN & POUTREL, 1988; PLERSSON et al., 1992). A detecção dessas substâncias pode ser de auxílio no

diagnóstico precoce de infecções da glândula mamária ou na identificação de processos de regressão de infecções. Este trabalho descreve a padronização das técnicas para detecção de soroalbumina bovina (BSA) e imunoglobulinas (Ig) no leite bovino e a aplicação destas técnicas em amostras de leite avaliadas previamente pelo CMT e exames bacteriológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de leite foram coletadas em 172 quartos mamários de vacas leiteiras pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, mantidas em sistema de produção semi-intensivo. Elas eram em sua maioria mestiças com predominância da raça Holandesa, variedade preto e branco. O sistema de ordenha era o mecânico, ocorrendo duas vezes ao dia. Os animais não haviam recebido tratamento prévio para mastite.

As amostras de leite foram avaliadas pelo CMT, exame bacteriológico e dosagens de BSA e Ig. O exame bacteriológico foi feito de acordo com recomendações do NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1990) e o teste do CMT, de acordo com SCHALM & NOORLANDER (1957).

Para determinação dos níveis de BSA e Ig, foram preparados soros anti-BSA e anti-imunoglobulina G por meio da hiperimunização de dois coelhos sadios para cada proteína purificada^a, de acordo com o protocolo descrito por GARVEY et al. (1977). Após o esquema de imunização, os animais foram sangrados, o soro hiperimune separado e frações específicas anti-BSA e anti-IgG foram obtidas através de precipitações sucessivas com sulfato de amônia, seguida de diálises (GARVEY et al., 1977).

O teste de imunodifusão radial simples foi utilizado para determinação dos níveis dessas duas proteínas de acordo com o descrito por MANCINI et al. (1965). Para a padronização do teste, as frações específicas dos anti-soros, previamente liofilizadas, foram diluídas em uma solução tampão borato para se obterem diferentes concentrações dos anticorpos. Ágar Noble a 3% foi fundido em tampão borato contendo 0,5% de polietileno glicol 4000 e misturado a igual quantidade da solução contendo anti-soro. Volumes de 8,0 ml desta solução foram usados para preparar as placas de imunodifusão. Após solidificação, poços de 3mm de diâmetro foram cortados no ágar. Em seguida foi tomada uma amostra de leite de uma novilha com reação negativa no CMT e exame bacteriológico negativo, ao qual se adicionou concentrações crescentes de BSA e IgG purificadas^a para quantificação do tamanho do halo de precipitação. As seguintes concentrações (mg/ml) foram testadas para BSA e Ig: 7,0 ; 6,0; 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,0; 1,75; 1,5; 1,25; 1,0; 0,875; 0,75; 0,625; 0,5; 0,375; 0,25; 0,125 e 0,0625. Volu-

mes de 5µl de cada concentração e do leite sem BSA e Ig foram testados. As placas foram incubadas a 4°C em câmara úmida, por 24 horas. Após este período, foi anotado o diâmetro do halo de precipitação, com o auxílio de uma régua apropriada^b. As amostras de leite contendo as diferentes concentrações das proteínas foram congeladas a -20°C e o teste repetido após diferentes períodos de estocagem nestas condições, sem haver alteração entre as leituras. Uma curva padrão foi construída para cada proteína, por meio da regressão da área do halo de precipitação em relação à concentração dos padrões. A concentração de 1mg/ml do anti-soro liofilizado foi utilizada para condução dos testes.

Para realização dos testes, as amostras de leite, estocadas a -20°C, foram descongeladas. Volumes de 5µl de cada amostra foi pipetado em duplicata nas placas de ágar contendo o anti-soro específico e preparadas de acordo com o descrito acima. Após a incubação, os diâmetros dos halos de precipitação foram mensurados e a quantificação de BSA e Ig foi feita com o uso da equação, obtida com a curva de regressão dos padrões. Os níveis de $\leq 0,2\text{mg/ml}$ e $\leq 0,5\text{mg/ml}$ de BSA e Ig, respectivamente foram definidos como fisiológicos com base nos trabalhos de CAFFIN et al. (1983), POUTREL et al. (1983), VERHOEFF & SMIT (1981) e CAFFIN & POUTREL (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados do CMT e dos níveis acima do fisiológico de BSA e Ig encontrados são mostrados na Tabela 1. Concentrações de BSA acima dos limites considerados fisiológicos foram observadas mais freqüentemente onde o CMT apresentou reação de maior severidade (escore +++). Houve maior concordância entre os escores negativos e traços com baixos níveis de BSA (dois casos positivos em

96 amostras examinadas). Nos escores + e ++ somente uma amostra das 33 examinadas apresentou níveis elevados de BSA. Estes resultados mostram que o aumento na concentração de BSA foi relacionado com a severidade da doença. De maneira semelhante, a maioria das amostras com níveis elevados de Ig apresentou escores +++ ao CMT. O número de amostras com níveis elevados nos escores + e ++ foi pequeno (9/33) e para os escores negativos e traços, 17 das 96 amostras examinadas foram positivas.

Diversos pesquisadores que estudaram o aparecimento de BSA em relação à mastite verificaram também um aumento na concentração de BSA em relação ao aumento nos escores do CMT ou na contagem de células somáticas no leite. Em alguns desses trabalhos, a variação da concentração de BSA foi correspondente a outros indicadores de inflamação, por exemplo, o inibidor da tripsina ou a enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase (GIESECKE & VILJOEN, 1974; ISHIKAWA et al., 1982; POUTREL et al., 1983; BAKKEN & THORBURN, 1985; MATILLA et al., 1986).

Aumento da concentração relativa das Ig com o aumento do escore do CMT foi observado por ISHIKAWA et al. (1982). Outros autores verificaram um aumento no nível de Ig com um aumento na contagem das células somáticas do leite (GUIDRY et al., 1983; PERSSON et al., 1992). O nível de Ig na glândula mamária em resposta a infecção pode permanecer elevado mesmo após a eliminação do agente infeccioso (LOGAN et al., 1986). Este fato, pode ter contribuído para o aparecimento de níveis elevados de Ig em amostras com escores negativos ou traços no CMT.

O número de amostras com níveis de BSA e Ig acima do limite fisiológico foi mais freqüente onde foram isolados *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus* (Tabela 2). Aumento destes níveis em relação à presença de bactérias inoculadas experimentalmente, ou após a infecção natural foram também relatados por diversos autores (CAFFIN et al., 1983; RAINARD & CAFFIN, 1983; CAFFIN &

Tabela 1 - Número de amostras de leite com níveis de soroalbumina (BSA) e imunoglobulina (Ig) acima do considerado fisiológico sobre o total de amostras examinadas, de acordo com escores do CMT.

ESCORES DO CMT	BSA (%)	Ig(%)
Negativo	2/72(2,7)	9/72(12,5)
Traços	0/24(0,0)	8/24(33,3)
+	1/19(5,2)	5/19(26,3)
++	0/14(0,0)	4/14(28,5)
+++	19/43(44,0)	35/43(81,4)
TOTAL	22/172(12,8)	61/172(35,5)

Tabela 2 - Número de amostras de leite que apresentam níveis de soroalbumina e imunoglobulina acima do considerado fisiológico sobre o total de isolamentos.

BACTÉRIA ISOLADA	SOROALBUMINA	IMUNOGLOBULINAS
<i>Corynebacterium</i> spp.	2/43	17/43
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/4	3/4
<i>Streptococcus</i> spp.	7/21	11/21
<i>Micrococcus</i> spp.		0/01/2
<i>Staphylococcus</i> spp.	0/0	3/16
TOTAL	10/68	34/86

POUTREL, 1988). Quartos mamários infectados por bactérias consideradas patógenos primários de mastite (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*) são relacionados a níveis elevados de BSA e Ig (VERHOEFF & SMIT, 1981; SHELDRAKE et al., 1983; BAKKEN & THORBURN, 1985). Quando a infecção se dá por patógenos considerados secundários (*Corynebacterium bovis*, *Micrococcus* spp e outras espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*) ou quartos mamários bacteriologicamente negativos os níveis de BSA são comparativamente menores.

Entre as 84 amostras onde os exames bacteriológicos foram negativos, 72 (85,7%) tinham níveis fisiológicos para BSA e 58 (69%) para Ig (Tabela 3). Um total de 12 amostras apresentaram níveis elevados de BSA e 26, de Ig. Nove das amostras com níveis elevados de BSA (75%) e 15 com níveis elevados de Ig (57,7%) apresentavam escores +++ ao CMT. Nas 88 amostras onde o exame bacteriológico foi positivo, 10 apresentaram níveis acima do limite fisiológico para BSA e 35 para Ig (Tabela 4). Todas as dez amostras com níveis elevados de Ig apresentavam escores +++ ao CMT. Estes resultados mostram novamente maior concordância de níveis elevados de Ig e BSA com escores +++ ao CMT. Contudo, considerando estes dois grupos de animais, verifica-se que os níveis de BSA e Ig obtidos entre eles, para cada categoria do CMT, foram semelhantes, não fornecendo um parâmetro para diferenciação entre os grupos.

Os resultados apresentados indicaram que a detecção destas duas proteínas por meio da técnica de imunodifusão radial pode ser usada como exames complementares ao CMT e/ou exames bacteriológicos para melhor caracterização de quadros mastíticos. A quantificação de BSA e Ig no leite de vacas com mastite subclínica pode auxiliar na detecção de processos inflamatórios da glândula mamária, forne-

Tabela 3 - Número de amostras de leite negativas ao exame bacteriológico e escores do CMT em relação aos níveis de soroalbumina e imunoglobulinas.

SOROALBUMINAS			IMUNOGLOBULINAS	
ESCORE DO CMT	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO
NEGATIVO	39	2	36	5
TRAÇOS	9	0	6	3
+	5	1	4	2
++	8	0	7	1
+++	11	9	5	15
TOTAL	72(85,7%)	12(14,3%)	58(69,0%)	26(30,9%)

Tabela 4 - Número de amostras de leite positivas ao exame bacteriológico e escores do CMT em relação aos níveis de soroalbumina e imunoglobulinas.

SOROALBUMINAS			IMUNOGLOBULINAS	
ESCORE DO CMT	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO
NEGATIVO	31	0	27	4
TRAÇOS	15	0	10	5
+	13	0	10	3
++	6	0	3	3
+++	13	10	3	20
TOTAL	78(88,6%)	10(11,4%)	53(60,2%)	35(39,8%)

cendo informação extra sobre o grau de lesão tecidual. Contudo, para detecção precoce de processo inflamatório da glândula mamária, a elevação dos níveis de BSA e Ig, considerados isoladamente, não se constituem indicadores sensíveis.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e a EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite pela utilização das instalações e animais. Ao Sr. Gilmar Pereira Alvim e a Dra. Marlice Teixeira Ribeiro pelo auxílio nos exames laboratoriais.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, USA.
b - Quipmeter, Helena Laboratories, Belamonte, Texas, USA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKEN, G., THORBURN, M. Seriousness and stability of subclinical mastitis assessed by quarter milk serum albumin. *Acta Vet Scand*, v. 26, p. 273-285, 1985.
- BRAMLEY, A.J. Mastitis. In: ANDREWS, A.H. BLOWEY, R.W., BOYD, H., EDDY, R.G. *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Blackwell, 1992. p. 289-300.
- CAFFIN, J.P., POUTREL, B. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. *J Dairy Sci*, v. 71, p. 2035-2043, 1988.
- CAFFIN, J.P., POUTREL, B., RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. *J Dairy Sci*, v. 66, p. 2161-2166, 1983.

- GARVEY, J.S., CREMEG, N.E., SUSSDORF, D.H. **Methods in Immunology**. 3. ed. Massachusetts: W.A. Benjamin, 1977. 545 p.
- GIESECKE, W.H., VILJOEN, M.H. The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows: A comparison of cytological methods and a monovalent radial immunodiffusion test. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 41, p. 51-74, 1974.
- GUIDRY, A.J., OST, M., MATHER, I.H., et al. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland. **Am J Vet Res**, v. 44, p. 2262-2267, 1983.
- ISHIKAWA, H., SHIMIZU, T., HIRANO, et al. Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment with levamisole. **J Dairy Sci**, v. 65, p. 653-658, 1982.
- LOGAN, E.F., MACKIE, D.P., MENNELY, D.J. Distribution of antibody in different immunoglobulin classes in experimental *Streptococcus agalactiae* infection of the bovine udder. **Brit Vet J**, v. 124, p. 358-363, 1986.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, p. 235-245, 1965.
- MATTILA, T., PYÖRÄLÄ, S., SANDHOLM, M. Comparison of milk antitrypsin, albumin, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cells and bacteriological analysis as indicators of bovine subclinical mastitis. **Vet Res Commun**, v. 10, p. 113-124, 1986.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL, INC. **Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder infection**, 3rd. ed. National Mastitis Council, Arlington, VA, 1990. 34 p.
- PERSSON, K., CARLSSON, A., HAMBLETON, C., et al. Immunoglobulins lysozyme and lactoferrin in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. **J Vet Med, Series B**, v. 39, p. 165-174, 1992.
- POUTREL, B., CAFFIN, J.P., RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. **J Dairy Sci**, v. 66, p. 535-541, 1983.
- RAINARD, P., CAFFIN, J.P. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG₁, IgG₂, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into udder of immunised and unimmunised cows. **Ann Rech Vét**, v. 14, p. 271-279, 1983.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J Am Vet Med Assoc**, v. 130, p. 199-207, 1957.
- SHELDRAKE, R.F., HOARE, R.J.T., MCGREGOR, G.D. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk. **J Dairy Sci**, v. 66, p. 542-547, 1983.
- VERHOEFF, J., SMIT, J.A.H. Bovine serum albumin and cell counts in the diagnosis of subclinical udder infection. **Vet Quartely**, v. 3, p. 38-45, 1981.