

TÍTULO

**DETECÇÃO DE SOROALBUMINAS E IMUNOGLOBULINAS NO LEITE
BOVINO COMO INDICADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA**

Jackson Barros do Amaral

1994

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA
ÁREA CLÍNICA MÉDICA

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

JACKSON BARROS DO AMARAL
ORIENTADORA, Dra. TEREZINHA PADILHA CHARLES

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
mestre em Ciências em Medicina
Veterinária - Patologia Veterinária.

Itaguaí, Rio de Janeiro

1994

TÍTULO

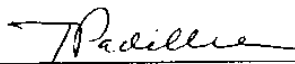
DETECÇÃO DE SOROALBUMINAS E IMUNOGLOBULINAS NO LEITE
BOVINO COMO INDICADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA

AUTOR

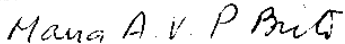
JACKSON BARROS DO AMARAL

Aprovada em 10 / 03 / 1994

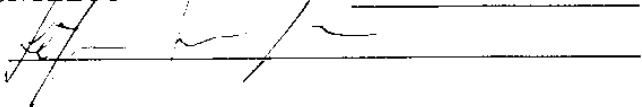
TEREZINHA PADILHA CHARLES



MARIA APARECIDA VASCONCELOS P. E BRITO



ZELSON GIACOMO LÓSS



Aos meus pais (In memoriam),
à minha tia Maria do Carmo,
pelo amor e carinho, aos
meus irmãos e sobrinhos,

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Dra. Terezinha Padilha Charles, pela excelente orientação e participação durante todas as etapas deste trabalho.

A Dra. Maria Aparecida Vasconcelos P. e Brito pela colaboração prestada no processamento do texto e pela orientação indispensável a realização dos exames bacteriológicos.

Ao Prof. Dr. Zelson Giacomo Lóss pela amizade e importância na concretização deste trabalho.

Aos Pesquisadores Renaldi Feitosa Brito, Vânia Maria Oliveira e Marlice Teixeira Ribeiro, pela especial atenção.

Ao Sr. Gilmar Pereira Alvim pela amizade e pelo auxílio nos exames laboratoriais.

Aos colegas Barcellos, José Placidino, Éder, Klinger e Clóvis pela especial atenção.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) através do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela importante contribuição.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta no êxito deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus por esta conquista.

BIOGRAFIA

Jackson Barros do Amaral, natural de Serra Talhada, Pernambuco, nascido no mês de fevereiro de 1960. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, em 1986. Em 1988, concluiu residência na Área de Clínica Médica de Ruminantes, na Clínica de Bovinos de Garanhuns PE. Em 1991, ingressou no Curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no Curso de Patologia Veterinária na área de concentração Clínica Médica. Em 1993, aprovado em Concurso Público para Pesquisador Científico, no Instituto de Zootecnia, Área de Sanidade Animal, Nova Odessa, São Paulo.

ÍNDICE

	Página
1. Introdução.....	01
2. Revisão da literatura.....	03
3. Material e métodos.....	11
4. Resultados e discussões	20
5. Conclusões.....	39
6. Referências bibliográficas.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de Amostras de Leite com Níveis de Soroalbumina Bovina Acima do Considerado Fisiológico ($>0,2\text{mg/ml}$) Colhidas em 172 Quartos Mamários em Três Diferentes Estágios da Lactação e Percentuais dos Totais.....	21
Tabela 2. Número de Amostras de Leite que Apresentaram Níveis de Soroalbumina Bovina Acima do Considerado Fisiológico ($> 0,2\text{mg/ml}$) Sobre o Total de Isolamentos.....	23
Tabela 3. Número de Amostras Negativas no Exame Bacteriológico e Escores do CMT em Relação aos Níveis de Soroalbumina Bovina.....	25
Tabela 4. Número de Amostras de Leite, Escores do CMT e Níveis de Soroalbumina Bovina em Amostras de Leite Positivas nos Exames Bacteriológicos.....	26

Tabela 5. Número de Amostras de Leite com Níveis de Imunoglobulina Acima do Considerado Fisiológico (>0,5mg/ml) nos Três Estágios Lactacionais Sobre o Total de Amostras Analizadas e os Escores do CMT Correspondentes.....	30
Tabela 6. Número de Amostras com Níveis de Imunoglobulina no Leite Acima do Considerado Fisiológico e Bactérias Isoladas.....	32
Tabela 7. Número de Amostras de Leite Negativas ao Exame Bacteriológico de Acordo com o Nível de Ig e Escores do CMT Correspondentes.....	34
Tabela 8. Número de Amostras de Leite Positivas ao Exame Bacteriológico de Acordo com o Nível de Ig e Escores do CMT Correspondentes.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Níveis de Soroalbumina Bovina Representadas de
Acordo com os Milímetros de Precipitação
Antígeno-Anticorpo para Patógenos Primários,
Patógenos Secundários, Exames Bacteriológicos
Negativos e Escores do "California Mastitis
Test"..... 28
- Figura 2. Níveis de Soroalbumina Bovina e Imunoglobulinas
em 172 Amostras de Leite Representadas de
Acordo com os Milímetros de Precipitação
Antígeno-Anticorpo..... 38

RESUMO

Com o objetivo de verificar a utilidade da detecção da soroalbumina e imunoglobulinas no leite como diagnóstico da mastite subclínica, avaliaram-se a relação entre a concentração dessas proteínas, o exame microbiológico e o "California Mastitis Test" (CMT). Foram examinados 172 quartos mamários em três diferentes estágios da lactação, definidos como: estágio I, compreendido entre o 1º e o 100º dia, estágio II, do 101º ao 200º dia e estágio III, do 201º ao 300º dia. Amostras de leite foram assepticamente colhidas de cada quarto mamário previamente examinado pelo CMT. Essas amostras foram imediatamente levadas ao laboratório para exames bacteriológicos. Uma alíquota de cada amostra foi congelada a -20°C e posteriormente testada para a presença de albuminas e imunoglobulinas, por meio da técnica de imunodifusão radial simples. Concentrações de albumina acima dos limites fisiológicos foram observadas mais frequentemente em amostras onde o CMT apresentou reação de maior severidade (+++) e naquelas onde foram isolados *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*. Em amostras onde não se isolou bactérias (84 das 172 examinadas), níveis fisiológicos de BSA foram observados em 72 delas, e entre as 88 positivas no exame bacteriológico, 10 apresentaram níveis de BSA acima do limite fisiológico. Os níveis

de imunoglobulinas considerados acima do limite fisiológico foram mais freqüentes nas amostras onde o CMT foi positivo (57,9%). Nas amostras com reação negativa ou traço no exame do CMT, 17,7% delas tinham níveis acima do fisiológico. A proporção das amostras de leite com níveis de imunoglobulinas acima do limite fisiológico foi maior naquelas onde foram isolados **S. aureus** e **Streptococcus spp.** Dentre as amostras com exame bacteriológico negativo, 69% apresentaram níveis fisiológicos de Ig, e entre as amostras positivas nos exames bacteriológicos, 39,8% apresentaram níveis acima dos fisiológicos. Em 22 amostras de leite onde ocorreu aumento de BSA acima dos níveis fisiológicos ocorreu também aumento do nível de Ig. A detecção de soroalbumina bovina e imunoglobulinas em amostras de leite pode ser usada como exame complementar ao CMT e/ou exames bacteriológicos para melhor caracterização de quadros mastíticos, auxiliando a identificação de processos inflamatórios e presença de microrganismos imunogênicos. A técnica de imunodifusão radial para detecção dessas proteínas é simples, os reagentes são fáceis de serem obtidos e/ou produzidos na maioria dos laboratórios, apesar de laboriosa.

Summary

This work aimed to evaluate the feasibility of milk serum albumin (BSA) and immunoglobulin (Ig) detection for the diagnosis of subclinical mastitis. Bacteriological 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 (<0.2mg/ml) and Ig (< 0.5mg/ml). Twenty-two samples had higher levels of both proteins and 39 samples had higher levels of Ig and physiological levels of BSH. 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.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação objetiva da ocorrência de enfermidades subclínicas em rebanhos de leite é geralmente difícil. 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 diagnóstico com esta capacidade. O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito facilmente por meio de exame clínico. Entretanto, o diagnóstico da forma subclínica está baseado em alterações citológicas e bioquímicas da secreção láctea e isolamento de microrganismos patogênicos.

As alterações citológicas são representadas pelo aumento de "células somáticas". Os neutrófilos são as principais células presentes na secreção láctea de vacas afetadas por mastite, seguidas pelos macrófagos e linfócitos. Vários testes foram desenvolvidos com o objetivo de estimar a contagem dessas células, sendo os principais o "California Mastitis Test" (CMT), "Wisconsin Mastitis Test" (WMT) e a prova de Whiteside.

Como consequência do processo inflamatório da glândula mamária, várias substâncias alteram a composição do leite, denunciando processos inflamatórios ou infecciosos. 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. Dentre estas substâncias, as albuminas e imunoglobulinas são proteínas séricas que estão presentes em quantidades ínfimas na secreção láctea ($<0,2$ e $<0,5$ mg/ml, respectivamente). Quando presentes em níveis acima destes limites fisiológicos, as albuminas representam um indicador sensível do aumento da permeabilidade capilar, enquanto as imunoglobulinas indicam também resposta específica a microrganismos. A disponibilidade de métodos que possam detectar alterações dos índices fisiológicos dessas duas proteínas na secreção láctea, em combinação com exames bacteriológicos pode servir de auxílio no diagnóstico preciso da mastite subclínica e na identificação de processos de regressão de infecções. Este trabalho descreve a padronização de duas 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.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O diagnóstico preciso das enfermidades da glândula mamária exige que o clínico veterinário utilize amplos conhecimentos de semiologia, realizando um exame clínico minucioso e completo. O exame físico da glândula mamária por meio da inspeção e palpação é complementado pelo exame macroscópico, microscópico e microbiológico do leite (BIRGEL, 1982). O diagnóstico rápido das mastites não só constitui uma exigência básica para a qualidade higiênica do leite, como também é decisivo para o resultado do tratamento, quando se deve evitar uma perda permanente na produção de leite (ROSENBERGER, 1983; MUNRO et al., 1984).

A forma clínica e subclínica das mastites constituem síndromes que devem ser encaradas de forma distinta, embora uma possa evoluir ou regredir no sentido da outra. Logo, a distinção é fundamental para estabelecimento de medidas preventivas e/ou curativas adequadas. A mastite clínica é caracterizada por uma sintomatologia evidente, de fácil interpretação e ocasiona marcante diminuição na produção de leite (BRAMLEY, 1992). A detecção da forma clínica depende do exame da glândula mamária e sua secreção (BRAMLEY, 1992). A mastite asséptica é rara e ocorre devido a desequilíbrios hormonais ou trauma localizados. A forma infecciosa é a mais prevalente, apesar de, em muitos casos,

não ser detectada por meio dos exames bacteriológicos das amostras de leite (BULLETINIDE, 1987).

A mastite subclínica é difícil de detectar e controlar e causa diminuição progressiva da produção de leite (GIESECK & BARNARD, 1985; LOUZÃ et al., 1986). Esta forma da enfermidade requer identificação prévia de sua etiologia para que medidas racionais de controle possam ser implementadas (BRAMLEY, 1992).

O diagnóstico da mastite subclínica apresenta dificuldades, tanto ao nível de campo quanto de laboratório. Ele se baseia em alterações na composição do leite e exames bacteriológicos (GIESECK & BARNARD, 1985; BRAMLEY, 1992). Existem várias provas, diretas e indiretas, usadas com este objetivo, sendo a prova de Whiteside, o "California Mastitis Test" (CMT) e o "Wisconsin Mastitis Test" (WMT) os principais testes indiretos baseados no aumento de "células somáticas" no leite, usados no campo ou em plataformas industriais. O CMT é a prova que mais se destaca para uso no campo, devido principalmente a sua simplicidade e rapidez. Ele avalia o grau de irritação existente nos quartos mamários em lactação, constituindo-se em um método de diagnóstico geral que não pode especificar a etiologia da enfermidade, não sendo portanto concludente (SCHALM & NOORLANDER, 1957; NADER FILHO et al., 1984; NADER FILHO et al., 1985).

Vários estudos têm tentado explorar as alterações da composição do leite mastítico para o estabelecimento de testes mais precisos, tanto para uso no campo quanto no laboratório e plataformas industriais. Entre as alterações que ocorrem no leite mastítico, o aumento da concentração das soroalbuminas bovinas no leite (BSA) e imunoglobulinas (Ig) são evidentes nos processos inflamatórios e infecciosos. Testes que possam identificar essas proteínas podem constituir instrumento auxiliar de grande utilidade no diagnóstico das mastites subclínicas (GIESECK & VILJOEN, 1974; SMITH et al., 1979; KALOREY & DHOLAKIA, 1984; BAKKEN & THORBURN, 1985; GIESECK & BARNARD, 1985; SANDHOLM & MATTILA, 1986; PEREZ et al., 1989; OSTENSSON, 1993).

Em condições normais, as albuminas passam do sangue para o leite em pequenas quantidades (GUIDRY et al., 1980). Os níveis de BSA variam de 0,1 a 0,4mg/ml no início da lactação e 0,1 a 0,2mg/ml em plena lactação (DIXON et al., 1961; PEREZ et al., 1989). Nos processos inflamatórios, ocorre aumento da permeabilidade da microcirculação sangüínea (SLAUSON & COOPER, 1982), elevando conseqüentemente o nível dessa proteína no leite (LECCE & LEGATES, 1959). Várias observações realizadas com mastite induzida por microrganismos ou infusão de endotoxinas evidenciaram que o nível de BSA começa a aumentar para valores acima do fisiológico em cerca de duas horas após a agressão, precedendo a migração dos leucócitos. A magnitude e duração

desse aumento é condicionada pela severidade e permanência da injúria (revisados por GIESECKE & VILJOEN, 1974).

Correlação significativa entre altas contagens de "células somáticas" no leite e concentrações elevadas de BSA têm sido observadas em alguns estudos (SMITH ET AL, 1979; GIESECKE & BARNARD, 1985). PEREZ et al., (1989) classificaram vacas com mastite em três categorias, de acordo com o CMT (+, ++ e +++) e verificaram que os níveis de BSA eram elevados nas vacas classificadas em +++. Resultados semelhantes foram observados por GUIURY et al., (1980) que encontraram correlação significativa entre níveis de BSA e o resultado do WMT. Em amostras de leite com escore do WMT menor que 10, a concentração de BSA era 8.7% do total das proteínas da amostra. Essa concentração quase duplicou nas amostras onde o WMT foi maior que 20 (RANDOLPH et al., 1974). Resultados semelhantes foram obtidos por GUIDRY et al., (1980) que estudaram amostras de leite colhidas em vacas 24 horas após a indução de inflamação. ISHIKAWA et al., (1982) e BAKKEN & THORBURN, (1985) verificaram que, em amostras de leite onde o escore do CMT era positivo, ocorreu um aumento significativo no nível de soroalbuminas bovinas. Concentrações médias de BSA de 0,21mg/ml foram determinadas em amostras de leite com contagens de células de 313×10^3 , enquanto que, em amostras com contagens médias de 8.282×10^3 , o nível médio subiu para 0.82mg/ml (ALI et al., 1980).

Aumento relativo de mais de 100% na concentração de BSA de vacas Holandesas e Guernseys foi observado quando amostras com contagens celulares menores que $2,5 \times 10^5$ e maiores que $1,0 \times 10^5$ foram comparadas (HAENLEIN et al., 1973). Correlações positivas maiores que 0,70 foram observados em outras experimentações onde a contagem de células e a concentração de BSA foram determinadas (SMITH et al., 1979; KITCHEN et al., 1980; HONKANEN-BUZALSKI & SANDHOLM, 1981).

O nível fisiológico de Ig na secreção láctea varia consideravelmente. Ele pode exceder 100mg/ml no colostro e diminuir para 0,5mg/ml em amostras de leite colhidas durante a lactação (LASCELLES, 1979). Nos processos inflamatórios, em decorrência do aumento da permeabilidade vascular, transporte seletivo ou síntese local, a concentração de Ig pode atingir até 50mg/ml (GUIDRY et al., 1980; NORCROSS, 1982; SHELDRAKE, 1987; OTERO & CRUZ, 1992; PERSSON et al., 1992).

O nível de Ig no leite está correlacionado, com o aumento de "células somáticas" no leite (PEREZ et al., 1989). Alguns autores verificaram, por meio de provas indiretas, que a concentração de Ig aumenta quando o escore dessas provas são altos. Em amostras de leite examinadas pelo WMT, RANDOLPH et al., (1974) verificaram que naquelas amostras onde o WMT era negativo (< 10), o percentual de Ig era 5%. Esse percentual aumentou para mais de

14% quando as amostras eram positivas (> 20). O escore do WMT de amostras de leite colhidas em vacas com inflamação aguda induzida aumentou cinco vezes, sendo este aumento do escore acompanhado do aumento do nível de Ig em 1,5 vezes (GUIDRY et al., 1980). Aumentos significativos na quantidade de Ig foram também observados em amostras de leite onde o CMT era positivo. HAENLEIN et al., (1973) observaram que, em amostras de leite com contagens de "células somáticas" superiores a $1,0 \times 10^5$, a percentagem de Ig era quase quatro vezes maior que nas amostras com contagens de células menores que $2,5 \times 10^5$.

O estudo de mastites induzidas tem evidenciado aumentos da concentração de BSA e Ig na secreção láctea. Aumenta significativa no nível dessas proteínas foi observado duas horas após a infusão de quartos mamários com endotoxinas de **Escherichia coli**. O nível de BSA e Ig nas amostras colhidas antes da infusão era 0,38 mg/ml e 0,34mg/ml, respectivamente, tendo aumentado para 4,49 mg/ml e 0,79 mg/ml, respectivamente. Quando estas proteínas atingiram o pique, quatro horas após a infusão, a concentração de BSA era 9,37 mg/ml e a de Ig era 1,35mg/ml (GUIDRY et al., 1983). Em exames de amostras de leite de vacas com inflamação aguda da glândula mamária, induzida pela infusão de glicogênio de ostra dissolvido em solução salina, ficou evidente que as quantidades de BSA e Ig sofrem um aumento superior a 100% e 50%, respectivamente, 24 horas após a infusão (GUIDRY et al., 1980).

Aumento do nível de BSA na secreção láctea de vacas submetidas a infusão com endotoxina de **Salmonella typhimurium** ocorreu duas horas após a infusão, atingindo o pique após quatro horas, declinando a níveis fisiológicos após 30 horas (OSTENSSON, 1993). Em vacas hiperimunizadas contra **Streptococcus agalactiae**, a concentração de Ig no leite aumentou 24 horas após a infecção experimental, sendo este aumento representado principalmente por imunoglobulina A (IgA) . Após este pique, o nível de IgA declina gradualmente. Setenta e duas horas após a infecção, imunoglobulinas G (IgG) foram detectadas. Esta classe de Ig atinge o máximo seis dias após a infecção e depois declina lentamente ate atingir níveis fisiológicos (LOGAN et al., 1986). Estudos do nível de BSA e Ig no leite, em casos de infusões de endotoxinas ou infecção experimental, demonstraram que o nível de BSA aumenta rapidamente, enquanto que Ig aumenta mais lentamente. Em contraste, a permanência de Ig e mais duradoura (ANDERSON & ANDREWS, 1977). Aumentos semelhantes aos ocorridos nas mastites induzidas têm sido observados também em amostras de leite colhidas em vacas com mastite clínica e subclínica em nível de campo (SINGH & GANGULI, 1975).

As informações disponíveis sugerem que a detecção de BSA e Ig na secreção láctea pode servir como um instrumento auxiliar no monitoramento de alterações da glândula mamária. Existem várias técnicas disponíveis capazes de quantificar essas

proteínas. Entre elas, destaca-se a imunodifusão radial, que é uma técnica simples, cujos reagentes e materiais são disponíveis na maioria dos laboratórios de Sanidade Animal dedicados aos estudos de enfermidades de bovinos de leite (GARVEY et al., 1977).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Amostras de leite foram colhidas de 172 quartos mamários de 45 vacas leiteiras primíparas ou multíparas em diferentes idades e estágios lactacionais. O Leite amostrado em cada quarto foi submetido ao CMT, exames microbiológicos e dosagens de BSA e Ig.

3.2. Características do rebanho

Os animais amostrados pertencem ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, os quais são mantidos em sistema de produção semi-intensivo. Os animais são em sua maioria mestiços com predominância da raça Holandesa, variedade preto e branco. O sistema de ordenha é o mecânico, ocorrendo duas vezes ao dia. Os animais foram avaliados nos três estágios lactacionais, correspondendo a 100, 200 e 300 dias o limite para a caracterização do primeiro, segundo e terceiro estágios respectivamente. Foram excluídos os primeiros 20 dias após o parto e os últimos 30 dias antes do término da lactação. Os animais permaneceram sem tratamento durante o experimento. Não haviam recebido tratamento prévio para mastite.

3.3. "California Mastitis Test"

3.3.1. Preparo do Reagente

O reagente para a prova do CMT foi preparado com o detergente comercial neutro segundo modificação feita por LANGENEGGER et al., 1981, de acordo com a seguinte fórmula:

Detergente comercial neutro	300 ml
Água destilada	600 ml
Púrpura de bromo-cresol, solução 0,5%	15 ml
Verde bromo-cresol, solução 0,5%	5 ml

O pH foi ajustado para 8,0, antes da adição dos indicadores. O reagente contrasta bem com o leite, dando uma coloração azul-escuro.

3.3.2. Procedimento para condução do CMT

Após a higienização e antissepsia das tetas, foram pesquisadas alterações macroscópicas do leite por meio da prova da caneca de fundo escuro. Em seguida, era feita a ordenha de 2 a 3ml de leite em cada copo da bandeja plástica, com o cuidado de evitar espuma. Posteriormente, a bandeja era inclinada até formar um ângulo de 45° para entornar o excesso de leite e deixar quantidade igual em cada copo. O reagente era então adicionado em quantidade igual a do leite. Movimentos circulares eram impressos à mistura e dentro de

15-20 segundos eram feitas a leitura e a interpretação de acordo com o sugerido por LANGENEGGER et al (1981), a saber:

CARACTERIZAÇÃO	LEUCÓCITOS/ml	RESULTADOS
Mistura homogênea, inalterada, coloração azul-clara	até 250.000	Negativo (-)
Presença de estrias e leve viscosidade que tendem a se desfazer	250.000 - 500.000	Suspeito (+-)
Ligeiro precipitado viscoso	500.000 - 1.000.000	Fraco positivo (+)
Viscosidade distinta com nítida formação de gel	1.000.000 - 5.000.000	Positivo (++)
Massa gelatinosa densa acumulada dentro do copo, geralmente azul-violácea	> 5.000.000	Forte Positivo (+++)

3.4. Exames bacteriológicos

3.4.1. Colheita de amostras de leite

Amostras foram colhidas de quartos mamários com escores negativos, suspeitos e positivos nos três estágios da lactação. Antes da ordenha, as tetas foram lavadas em água corrente, desinfetadas com uma solução antisséptica (iodoform 1:320) e enxugadas com papel toalha. Em seguida, a pele das tetas e o orifício do canal galactóforo eram limpos com álcool a 70%. Os primeiros jatos eram usados para a prova da caneca de fundo escuro e CMT, conforme descrito anteriormente. Em seguida, 5ml de leite eram colhidos de cada quarto mamário em tubos de ensaio esterilizados. As amostras

eram então enviadas imediatamente ao laboratório para exames microbiológicos.

3.4.2. Procedimentos Bacteriológicos

As amostras foram inicialmente plaqueadas em agar sangue de carneiro a 5% e ágar MacConckey e incubadas por 24 a 48 horas a 37°C. As colônias isoladas foram observadas quanto a morfologia, tipo de hemólise e submetidas a identificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Após o exame microscópico das colônias isoladas, os microrganismos foram classificados em gênero, de acordo com as seguintes técnicas:

Streptococcus: As colônias isoladas eram pequenas (aproximadamente 0,5 mm de diâmetro), acinzentadas e apresentavam ou não área definida de hemólise. Para melhor avaliação da morfologia das bactérias, procedeu-se a repicagem em caldo cérebro-coração (BHI) enriquecido com a adição de quatro a cinco gotas de soro eqüino e incubado por 24 horas a 37°C. A partir da cultura em caldo era feito o esfregaço corado pelo método de Gram para observação das células típicas de cocos gram positivos em cadeias. Efetuava-se também a prova da catalase.

***Staphylococcus* e *Micrococcus*:** As colônias isoladas eram opacas e brilhantes, com aproximadamente 1,0 mm de diâmetro após 24 horas de incubação. Algumas colônias apresentavam pigmento amarelado. Outras apresentavam hemólise total no ágar sangue. Estas colônias eram submetidas à coloração pelo método de Gram e apresentavam-se como cocos gram positivos em cachos. Eram repicadas para placa de ágar nutritivo e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, efetuava-se as provas da catalase, coagulase, oxidação e fermentação da glicose (O/F).

Corynebacterium sp: As colônias isoladas eram pequenas, esbranquiçadas e, geralmente, visíveis somente após 48 horas de incubação. Realizava-se a observação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. As células se apresentavam como bastonetes gram positivos, pequenos, delgados, pleomórficos e não formavam esporos. Geralmente se apresentavam em pequenos grupos, em paliçadas ou letras chinesas. Estas colônias eram repicadas para caldo BHI contendo 4 a 5 gotas de soro eqüino de onde era feito a prova da catalase e novo esfregaço para confirmação da morfologia celular.

Coliformes: As colônias se apresentavam grandes e acinzentadas no ágar sangue e fermentadoras da lactose e mucóides no ágar MacConkey após 24 horas de

incubação, a 37°C. Esfregaços corados pelo método de Gram mostravam bastonetes pequenos ou coco-bacilos gram negativos. As colônias eram repicadas para ágar nutritivo e incubadas à 37°C. A partir do crescimento, em ágar nutritivo, eram semeadas em meios apropriados para as provas de: produção de indol, mobilidade, produção de urease, oxidação e fermentação da glicose (O/F), vermelho de metila e fermentação da glicose, sacarose e/ou lactose, produção de gás e sulfeto de hidrogênio (H₂S) no ágar ferro tríplice açúcar (TSI).

3.5. Determinação dos níveis de soroalbuminas e imunoglobulinas bovina

3.5.1. Colheita de amostras de leite

Após a colheita de amostra para exame bacteriológico, 20ml de leite eram colhidos em tubos de ensaio esterilizados. As amostras eram então conservadas a -20°C até serem analisadas.

3.5.2. Produção de anti-soros específicos

Soro antialbumina e antiimunoglobulina G bovinos foram preparados por meio da hiperimunização de dois coelhos

adultos sadios para cada proteína. Para obtenção de cada anti-soro, os coelhos foram inoculados por via intradérmica, em intervalos de 15 dias com 3 mg de albumina bovina ou imunoglobulina G. Para a aplicação intradérmica das proteínas, foi feita uma suspensão de 3 mg de cada proteína em 1,0 ml de solução salina estéril e emulsificadas em 1,0 ml de adjuvante completo de Freund. Após cinco inoculações consecutivas, os animais foram sangrados na veia marginal da orelha ou tiveram punção intracardiaca. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 2500 rotações por minuto, durante 15 minutos, para separação do soro. O soro foi então inativado em banho-maria a 56°C, durante 30 minutos, e conservado a -20°C, até que a precipitação das imunoglobulinas fosse efetuada.

Para precipitação das imunoglobulinas anti-albumina bovina e antiimunoglobulina bovina, o soro foi descongelado e em seguida submetido a precipitações sucessivas com sulfato de amônio de acordo com o descrito em GARVEY et al., (1977). Os sais de amônio foram removidos por diálise contra tampão barato (GARVEY et al., 1977). Em seguida, liofilizadas e armazenadas a -20°C para uso posterior.

3.5.3. Padronização dos testes

Placas para determinação de BSA e Ig bovina, por imunodifusão radial simples, foram preparadas de acordo com o

descrito por MANCINI et al. (1965). Anti-soro específico liofilizado, produzido em coelhos conforme descrito acima, foi diluído em diferentes concentrações em uma solução tampão e mantidos em banho-maria a 56°C. Ágar Noble a 3% foi fundido com 0,5% de polietileno glicol 4000 na mesma solução tampão. Iguais quantidades da solução contendo anti-soro e da solução contendo o ágar eram então misturadas, homogeneizadas e mantidas a 56°C durante 10 minutos. Posteriormente, volumes de 8 ml da solução foram dispensados em placas apropriadas. Após solidificação, poços de 3mm de diâmetro foram cortados no ágar com o auxílio de um "gel puncher". Em seguida, 5µl de amostras-padrão de leite contendo quantidades crescentes de cada proteína foram pipetadas nos poços. As placas foram então incubadas a 4°C em câmara úmida, por 24 horas, e em seguida submetidas à leitura, quando era anotado o diâmetro do halo de precipitação antígeno-anticorpo, feita com o auxílio de uma régua apropriada (QUIPMETER, Helena Laboratories, Belamonte, Texas). Uma curva padrão foi construída para cada proteína testada, por meio da regressão da área do halo precipitado em relação a concentração dos padrões, tendo se identificado a concentração de 1mg de proteína liofilizada para cada mililitro de solução como ideal para a condução dos testes.

3.5.4. Testes de Imunodifusão Radial em amostras de leite

As amostras de leite eram descongeladas totalmente, e em seguida 5 μ l de cada amostra eram pipetadas em duplicatas nas placas de ágar preparadas de acordo com o descrito anteriormente. Após a incubação, os diâmetros dos halos de precipitação foram mensurados baseados na técnica descrita acima. A quantificação das BSA e Ig foram feitos com o uso da equação obtida com a curva de regressão dos padrões.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas amostras de leite analisadas, concentrações de BSA acima dos limites considerados fisiológicos foram observadas mais freqüentemente onde o CMT apresentou reação de maior severidade (escore +++) (Tabela 1). Houve maior concordância entre os escores negativos e traços com baixos níveis de BSA (dois casos positivos com níveis acima do fisiológico em 96 amostras avaliadas). Estes resultados mostram que houve um aumento na concentração de BSA com a severidade da doença.

Diversos pesquisadores que estudaram o aparecimento de BSA em relação à mastite verificaram também um aumento da concentração de BSA em relação ao aumento nos escores do CMT ou na contagem de "células somáticas" no leite (GIESECKE & VILJOEN, 1974; HONKANEN - BUZALSKI & SANDHOLM, 1981; ISHIKAWA et al., 1982; KALOREY & DHOLAKIA, 1984; POUTREL et al., 1983; BAKKEN & THORBURN, 1985 e PEREZ et al., 1989). Em alguns desses trabalhos, a variação da concentração de BSA foi correspondente a outros indicadores de inflamação, como exemplo, inibidor da tripsina ou a enzima N-acetil-B-D-glucosaminidase (HONKANEN-RUZALSKI & SANDHOLM, 1981; MATILLA et al., 1986; PYÖRÄLÄ, 1988).

Tem sido observado também um aumento significativo de BSA de acordo com o estágio da lactação. GIESECKE & VILJOEN (1974) relataram um aumento no final da lactação. Outros

Tabela 1 - Número de Amostras de Leite com Níveis de BSA Considerados
Acima do Fisiológico ($> 0,2$ mg/ml), colhidas em 172
Quartos Mamários, em Três Diferentes Estágios da Lactação.

ESCORE DO CMT	ESTÁGIOS			TOTAL
	I	II	III	
Negativo	1/41	1/24	0/7	2/72 (2,8%)
Traços	0/13	0/7	0/4	0/24 (0%)
+	1/7	0/8	0/4	1/19 (5,3%)
++	0/10	0/4	0/0	0/14 (0%)
+++	2/13 (15,4%)	7/12 (58,3%)	10/18 (55,5%)	19/43 (44,9%)
TOTAL	4/84 (4,8%)	8/55 (14,5%)	10/33 (30,3%)	22/172 (12,79%)

autores, além de verificarem aumentos nos níveis de BSA próximos ao período de regressão da glândula mamária, verificaram um aumento destes níveis no período próximo ao parto, por influência hormonal (POUTREL et al., 1983; SHELDRAKE et al., 1983; SAAD et al., 1990). Quando se considera o estágio da lactação, nos resultados obtidos nesse estudo, verifica-se que o número de amostras com níveis de BSA acima do limite fisiológico foi maior nas amostras colhidas no terceiro estágio de lactação. Contudo, isto só foi observado quando o escore do CMT foi alto +++, (Tabela 1). As amostras do terceiro estágio, com escores menores (negativo, traços, + ou ++) não apresentaram níveis elevados de BSA. Embora, o número de amostras examinadas nos escores + e ++ tenha sido pequeno, parece que os níveis observados no terceiro estágio da lactação se relacionam mais à severidade da reação inflamatória, do que ao estágio da lactação.

O número de amostras onde se observou níveis de BSA acima do limite fisiológico foi mais freqüente naquelas em que foram isolados **Streptococcus sp.** e **Staphylococcus aureus** (Tabela 2). Outros estudos têm relacionado o aumento da concentração de RSA com a infecção bacteriana na glândula mamária. RAINARD & CAFFIN (1983) detectaram aumento de BSA e outros indicadores de inflamação após a inoculação intramamária de **Escherichia coli**. Um aumento significativo de BSA foi relacionado a quartos mamários infectados por

Tabela 2 - Número de Amostras de Leite que Apresentaram Níveis de BSA Acima do Considerado Fisiológico ($> 0,2\text{mg/ml}$) sobre o total de isolamentos .

BACTÉRIA ISOLADA	PROPORÇÃO DE ISOLAMENTOS
<i>Corynebacterium sp.</i>	2/43 (4,6%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/4 (25%)
<i>Streptococcus sp.</i>	7/21 (33,3%)
TOTAL	10/68 (14,7%)

S. aureus (ISHIKAWA et al., 1982). De modo semelhante, 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 (BAKKEN & THORBURN, 1985; VEKHOEFF & SMITH, 1981 e SHELDRAKE; et al., 1983). Nestes casos, quartos mamários infectados por patógenos considerados secundários (**Corynebacterium bovis**, micrococos e outras espécies de estafilococos e estreptococos) ou quartos mamários bacteriologicamente negativos apresentam níveis de BSA comparativamente menores.

Neste trabalho, nas 84 amostras onde os exames bacteriológicos foram negativos, níveis fisiológicos de BSA foram observados em 72 amostras (Tabela 3). Em 50 amostras onde os escores do CMT foram "negativos ou traços", duas apresentaram níveis de HSA acima do limite fisiológico. Nas 34 amostras positivas ao CMT (+, ++ e +++), 10 (29%) indicaram níveis de RSA acima do limite fisiológico. Dentre as amostras classificadas com escore +++, 75% apresentaram níveis de BSA acima do limite fisiológico. Um total de 88 amostras foram positivas ao exame bacteriológico. Destas, 10 apresentaram níveis de BSA acima do limite fisiológico e todas estas apresentaram o escore +++ ao CMT (Tabela 4).

Os diâmetros dos halos de precipitação obtidos para BSA em amostras bacteriologicamente positivas e negativas

Tabela 3 - Número de Amostras de Leite Negativas no Exame Bacteriológico e Escores do CMT em Relação aos Níveis de Soroalbumina Bovina.

ESCORE DO CMT	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO
Negativo	39 (54,1%)	2 (16,6%)
Traços	9 (12,5%)	0
+	5 (6,9%)	1
++	8 (11,1%)	0
+++	11 (15,2%)	9 (75,5%)
TOTAL	72	12

Tabela 4 - Número de Amostras de Leite, Escores do CMT e Níveis de Soroalbumina Bovina em Amostras de Leite Positivas nos Exames Bacteriológicos

ESCORE DO CMT	NÍVEIS FISIOLÓGICOS (+)	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO
Negativo	31 (39,7%)	0
Traços	15 (19,2%)	0
+	13 (16,6%)	0
++	6 (7,6%)	0
+++	13 (16,6%)	10
TOTAL	78	10

foram projetado na figura 1. Como pode ser observado, as concentrações mais elevadas de BSA correspondem a escores +++ ao CMT. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por BAKKEN & THORBURN (1985) para os patógenos primários e secundários. Os patógenos secundários induziram baixos níveis de BSA, mesmo para escores +++ ao CMT.

Níveis elevados de BSA onde houve resultado negativo no exame bacteriológico e elevada concentração de "células somáticas", (CMT +++) podem estar relacionados a amostras positivas para mastite, mas onde não foi possível obter uma cultura positiva. As flutuações observadas no número de microrganismos excretados por uma glândula mamária infectada podem explicar a ausência de isolamento bacteriano no cultivo de uma amostra de leite. Cultura de duas amostras tendem a aumentar as chances de isolamento bacteriano (GRIFFIN et al., 1987; BRAMLEY, 1992 e JENSEN & KNUDSEN, 1988).

Amostras de leite de onde se isolaram patógenos secundários apresentavam níveis baixos de BSA, sugerindo pouca irritação tecidual causada por esses microrganismos, mesmo quando havia alta concentração de "células somáticas", (CMT positivo). As amostras em que houve isolamento de patógenos considerados primários e baixa quantidade de células no leite (CMT negativo ou traços) podem estar relacionadas a lesão epitelial menos severa na glândula mamária. GIESECKE & VILJOEN (1974) afirmaram que o aumento dos níveis de BSA somente ocorrerá na presença de dano do

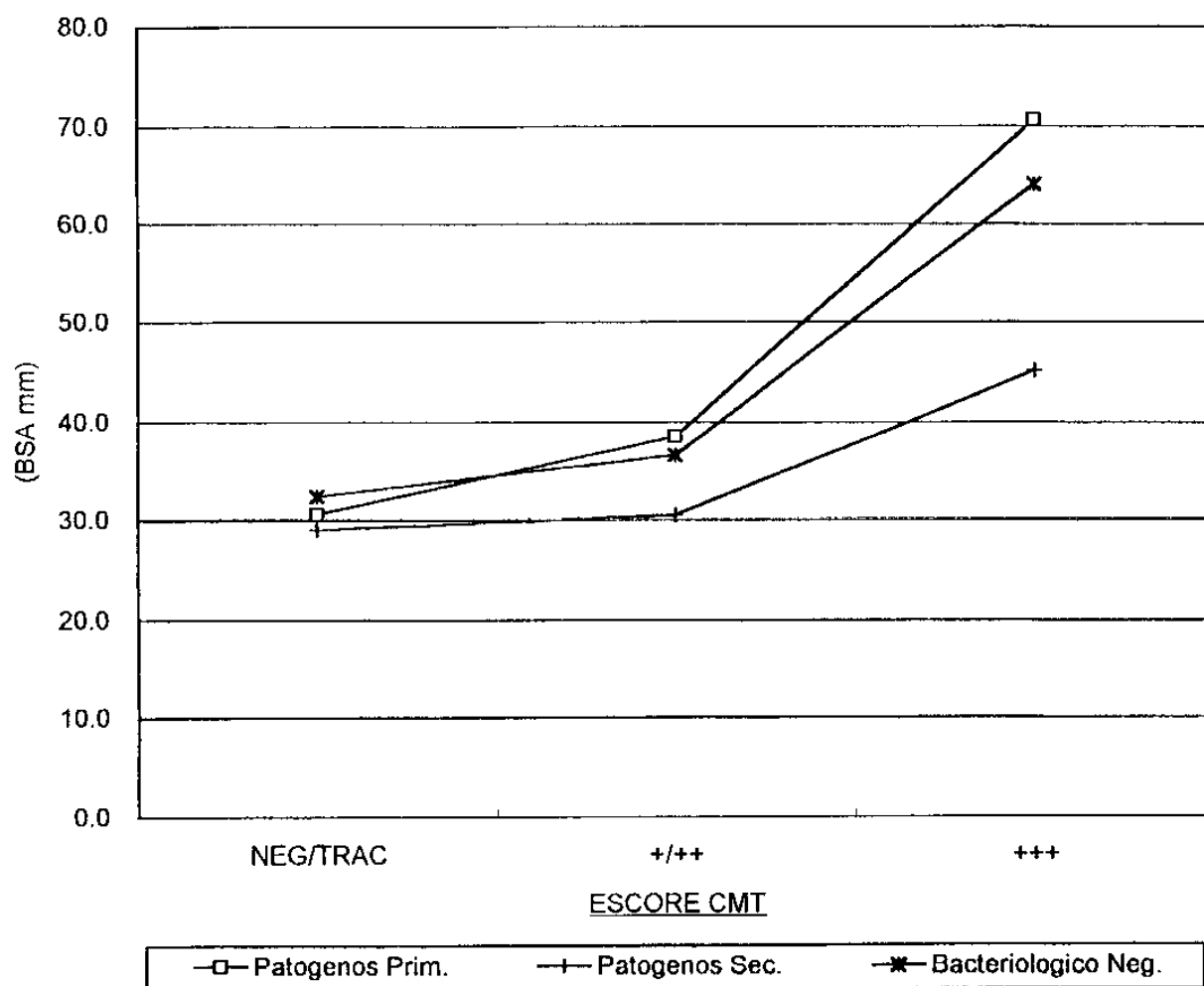


Figura 1. Níveis de BSA Representadas de Acordo com os Milímetros de Precipitação Antígeno - anticorpo para Patógenos Primários, Patógenos Secundários, Exames Bacteriológicos Negativos e Escores do "California Mastitis Test"

epitélio secretor. GIESECKE & VILJOEN (1974) e GIESECKE & BARNARD (1985) utilizaram a avaliação de BSA, juntamente com contagem de "células somáticas" e exame bacteriológico, para diferenciar infecção do canal da teta da infecção do úbere. Amostras bacteriologicamente positivas, com baixa contagem de "células somáticas" e níveis elevados de BSA, foram consideradas como infecção irrelevante do canal da teta. Quando a contagem dessas células estava elevada, considerou-se como infecção relevante do canal da teta.

Os dados relativos à presença de Ig nas amostras de leite mostram que o número de quartos mamários com níveis acima do limite considerado fisiológico ($> 0,5\text{mg/ml}$) foi mais freqüente onde o CMT foi positivo (57,9%). Nas amostras com escores de CMT negativo ou traços, 17,7% tinham níveis acima do fisiológico (Tabela 5). De maneira semelhante aos níveis observados para BSA, a maioria das amostras com níveis elevados de Ig apresentava escores +++ ao CMT, nos três estágios da lactação.

O aumento da concentração de Ig no leite de animais com mastite tem sido relacionado ao grau de permeabilidade vascular nos tecidos da glândula mamária. Quando aumenta a permeabilidade capilar, durante o processo inflamatório, a concentração de Ig na secreção mamária aumenta (SINGH & GANGULE, 1975 e OTERO & CRUZ, 1992).

Tabela 5 - Número de Amostras de Leite com Níveis de Ig Acima do Considerado Fisiológico ($> 0,5\text{mg/ml}$) nos Três Estágios Lactacionais sobre o total de Amostras Analisadas e os Escores do CMT Correspondentes .

ESCORE DO CMT	ESTÁGIOS			TOTAL
	I	II	III	
Negativo	6/41	2/24	1/7	9/72 (12,5%)
Traços	6/13	7/1	1/4	8/24 (33,3%)
+	3/7	1/8	1/4	5/19 (26,3%)
++	4/10	0/4	0/4	4/14 (28,5%)
+++	11/13	10/12	10/12	35/43 (81,4%)
TOTAL	30/84 (35,7%)	14/55 (25,4%)	17/33 (51,5%)	61/172 (35,5%)

Inoculação intramamária de endotoxina bacteriana de **S. agalactiae** resultou em um aumento de IgG1 e IgG2 no leite (ANDERSON & ANDREWS, 1977 e PERSSON et al., 1992). Juntamente com o aumento de IgG, são relatados aumentos no nível de BSA e na contagem de "células somáticas". RAINARD & CAFFIN (1983) relataram que, após a exposição intramamária a **E. coli**, os níveis de BSA, IgG1 e IgG2 aumentaram e decresceram em paralelo. Aumento da concentração relativa das Ig com o aumento do escore do CMT foi observado por ISHIKAWA et al. (1982) e com relação aos resultados do WMT por RANDOLPH et al. (1974). Outros autores verificaram um aumento no nível de Ig com um aumento na contagem das "células somáticas" do leite (GUIDRY et al. 1983 e PERSSON et al. 1992).

Com relação aos exames bacteriológicos, a proporção de amostras de leite com níveis de Ig acima do limite considerado fisiológico foi maior nas amostras onde **S. aureus** e **Streptococcus sp.** foram isolados (Tabela 6). Resultados semelhantes para **S. aureus** foram relatados por CAFFIN et al. (1983) e CAFFIN & POUTREL (1988). Estes autores observaram que havia um aumento na concentração de IgG1 e IgG2 também para infecção por **Corynebacterium bovis**, quando esta bactéria persistia no úbere por todo o período da lactação.

CAFFIN et al. (1983) não encontraram uma relação entre aumento de IgG1 e contagem de "células somáticas", ou

Tabela 6 - Número de Amostras com Níveis de Ig no Leite Acima do Fisiológico e Bactérias Isoladas

BACTÉRIA ISOLADA	TOTAL (%)
<i>Corynebacterium sp.</i>	17/43 (39,5%)
<i>Micrococcus sp.</i>	1/2 (50,0%)
<i>Staphylococcus sp.</i>	3/16 (18,8%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3/4 (75,0%)
<i>Streptococcus sp.</i>	11/21 (52,4%)

entre o aumento de IgG1 e infecção por **Streptococcus sp.** CAFFIN & POUTREL (1988) encontraram uma relação entre aumento de IgG2 e contagem de "células somáticas" e entre IgG2 e infecção por **Streptococcus sp.**

Nos resultados encontrados neste trabalho, houve um menor número de amostras onde se isolou **Staphylococcus sp.** e ocorreu um aumento de IgG. Embora, a porcentagem de amostras onde se isolou **Micrococcus sp.** foi de 50%, este dado se refere a apenas duas amostras e não pode ser generalizado para este grupo de bactérias. Microrganismos considerados patógenos secundários induziram níveis não significativos de IgG2 no leite (CAFFIN & POUTREL, 1988). Contudo, infecção por estafilococos coagulase negativo apresentou um aumento relativo nos níveis de IgG1 no primeiro e no segundo estágio da lactação (CAEFIN et al., 1983).

Dentre as 84 amostras com exame bacteriológico negativo, 69% apresentaram níveis de Ig considerados fisiológicos e 30,9% apresentavam níveis acima do fisiológico (Tabela 7). Estes resultados revelam novamente maior concordância de níveis elevados de Ig com escores +++ ao CMT. LOGAN et al. (1986) monitoraram a resposta imune na glândula mamária, em novilhas infectadas por **S. agalactiae**, e verificaram que o aumento de Ig ocorreu até 72 horas após a infecção, alcançou um nível máximo 6 dias após a infecção, e, após este período, os níveis declinaram lentamente. O fato de os níveis de Ig permanecerem elevados, mesmo após a eliminação

Tabela 7 - Número de Amostras de Leite Negativas no Exame Bacteriológico de Acordo com o Nível de Ig e Escores do CMT Correspondentes.

ESCORE DO CMT	NÍVEIS	NÍVEIS
	FISIOLÓGICOS	ACIMA DO FISIOLÓGICO
Negativo	36 (62,0)	5 (19,2%)
Traços	6 (10,3)	3 (11,5%)
+	4 (6,8)	2 (7,6%)
++	7 (12,0)	1 (3,8%)
+++	5 (8,6)	15 (57,6%)
TOTAL	58	26

do agente infeccioso, pode ter contribuído para o aparecimento dos níveis de Ig em amostras bacteriologicamente negativas e com CMT negativo. Entre as 88 amostras positivas nos exames bacteriológicos, 35 apresentaram níveis de Ig no leite acima dos níveis fisiológicos (Tabela 8).

Os diâmetros dos halos de precipitação obtidos para Ig e BSA foram projetados na Figura 2. As linhas verticais e horizontais que limitam os quadrantes A, B, C e D definem os limites fisiológicos de BSA (vertical) e Ig (horizontal), de acordo com os padrões estudados. Em 22 amostras de leite com níveis elevados de BSA, houve 100% de aumento nos níveis de Ig (quadrante C). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de GUIDRY et al. (1980, 1983), cujos níveis de IgA, IgG1, IgG2 e IgM correlacionaram significativamente com os níveis de BSA em amostras de leite avaliadas antes e depois da indução de mastite, por meio da infusão de endotoxina de *E. coli*. Estes resultados sugerem processos infecciosos em que houve um aumento de permeabilidade capilar e transudação de ambas as proteínas para o leite. Sugerem, também, uma maior gravidade da lesão tecidual, pois os diâmetros dos halos de precipitação estavam aumentados. No quadrante D são apresentados resultados de 39 amostras com níveis de Ig acima do fisiológico, cujos níveis de BSA apresentavam-se fisiológicos. Resultados de GUIDRY et al. (1983) revelam que os níveis de IgG1 no leite tendem a permanecer elevados na presença de rápido declínio nas concentrações de BSA,

indicando a possibilidade de um transporte ativo de IgG1 da circulação sangüínea para o leite. Pode-se especular que o transporte seletivo de IgG seria em decorrência de resposta específica aos agentes infecciosos. No quadrante A estão representadas todas as amostras de leite dos quartos mamários com níveis fisiológicos de BSA e Ig bovinas. No quadrante B, onde deveriam ser representados os resultados dos valores elevados de BSA e normais de Ig, não foram encontradas amostras com estas características. Este resultado está de acordo com a afirmação de que a passagem de albumina do sangue para o leite está relacionada com o aumento de permeabilidade capilar que também eleva os níveis de Ig.

Tabela 8 - Número de Amostras de Leite Positivas ao Exame Bacteriológico de Acordo com o Nível de Ig e Escores do CMT correspondentes.

ESCORE DO CMT	NÍVEIS FISIOLÓGICOS	NÍVEIS ACIMA DO FISIOLÓGICO
Negativo	27 (50,9%)	4 (11,4%)
Traços	10 (18,8%)	5 (14,2%)
+	10 (18,8%)	3 (8,5%)
++	3 (5,6%)	3 (8,5%)
+++	3 (5,6%)	20 (57,1%)
TOTAL	53	35

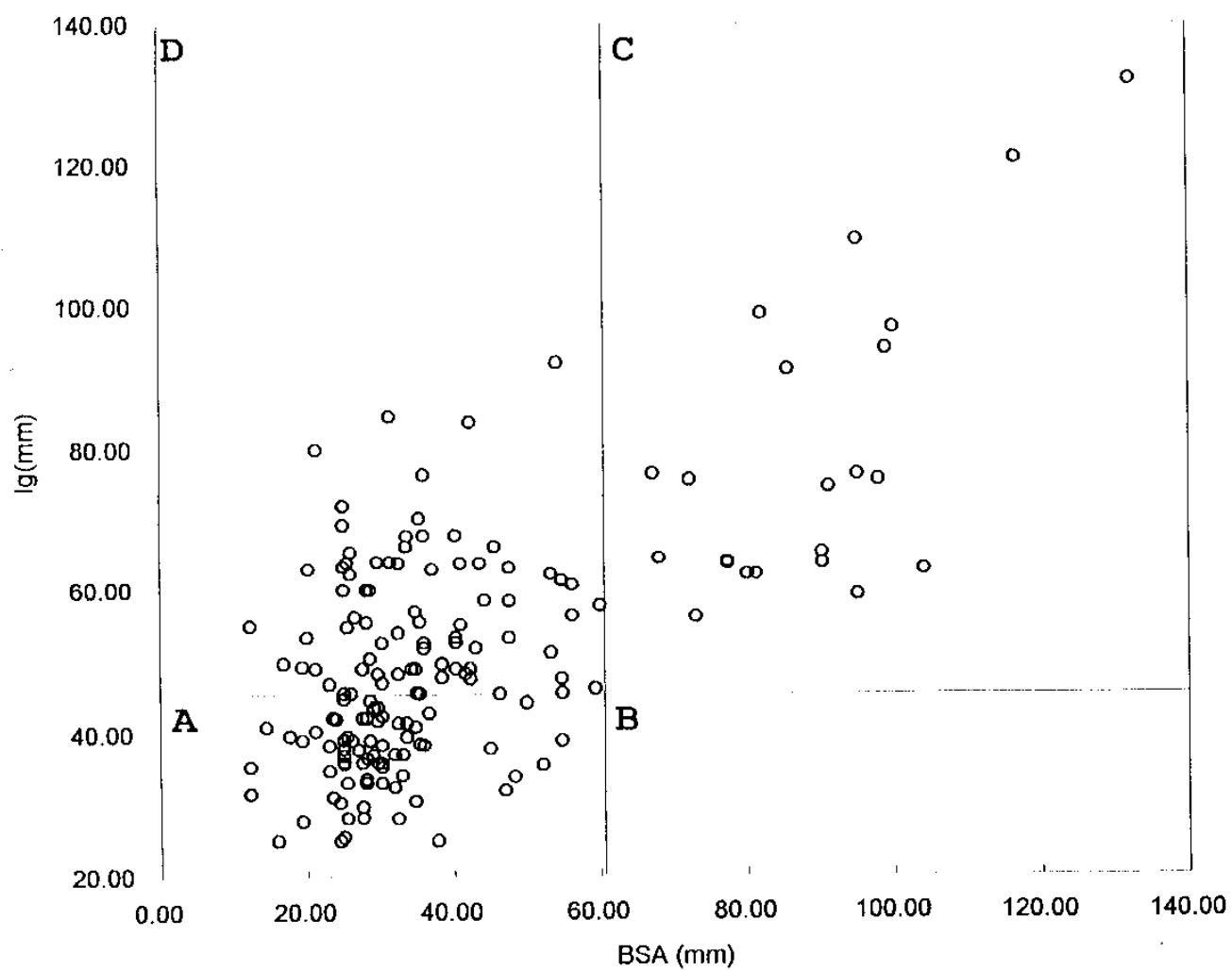


Figura 1. Níveis de BSA e Ig em 172 Amostras de Leite Representadas de Acordo com os Milímetros de Precipitação Antígeno - Anticorpo

5. CONCLUSÕES

A detecção de HSA e de Ig, 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. Essa técnica é simples; os reagentes são fáceis de serem obtidos e/ou produzidos na maioria dos laboratórios. O emprego da dosagem dessas proteínas pode auxiliar na detecção de processos inflamatórios da glândula mamária e a presença de microrganismos imunogênicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.E.; ANDREWS, A.T.; CHEESMAN, G.C. Influence of elevated somatic cell count on casein distribution and cheese-making. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, n. 3, p. 393-400, 1980.
- ANDERSON, M.; ANDREWS, A.T. Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, p. 223-235, 1977.
- BAKKEN, G.; THORBURN, M. Seriousness and stability of subclinical mastitis assessed by quarter milk serum albumin. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 26, p. 273-285, 1985.
- BIRGEL, E. H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mastite. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p 177 - 213.
- 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.
- BULLETIN OF THE INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Bovine mastitis: Definition and guidelines for diagnosis**. Brussels: IDF, n. 211, 1987. 24 p.

CAFFIN, J.P.; POUTREL, B. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2035-2043, 1988.

CAFFIN, J.P.; POUTREL, B.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 10, p. 2161 - 2166, 1983.

DIXON, F.J.; WEIGLE, W. O.; VAZQUEZ, J.J. metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. **Laboratory Investigation**, Baltimore, n.10, p. 216-237, 1961.

GARVEY, J.S.; CREMEG, N.E.; SUSSDORF, D.H. **Methods in Immunology**. 3.ed. Massachussetts: W. A. Benjamin, 1977. 545 p.

GIESECK, W.H.; BARNARD, M.L. Persistence deterioration and improvement of various subclinical conditions as major variables of the dynamic balance of udder health states monitored by means of the IDF/BSA criteria. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, Gelsenbirchen - Buer, v. 37, n. 4, p. 466-472, 1985.

GIESECK, 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 Journal Veterinary Research**, Pretoria, v. 41, n. 2, p. 51-74, 1974.

- GRIFFIN, T.K.; MORANT, S.V.; DODD, F.H. Diagnosing infectious subclinical mastitis in surveys of large scale experiments. The analysis and interpretation of the results of an international trial organised by the IDF mastitis expert group (A2). **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 211, p. 9-16, 1987.
- GUIDRY, A.J.; OST, M.; MATHER, I.H.; SHAINLINE, W.E.; WEINLAND, B.T. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, n. 12, p.2262-2267, 1983.
- GULDY, A.J.; PAAPE, M.J.; PEARSON, R.E. Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 41, n. 5, p. 751-753, 1980.
- HAENLEIN, G.F.W.; SCHULTZ, L.H.; ZIKAKIS, J.P. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 8, p. 1017-1024. 1973.
- HONKANEN-BUZALSKI, T.; SANDHOLM, M. Tripsin-inibitors in mastitic milk and colostrum: Correlation between tripsin-

inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 213-223, 1981.

ISHIKAWA, H.; SHIMIZU, T.; HIRANO, H.; SAITO, N.; NAKANO, T. Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment with levamisole. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, p. 653-658, 1982.

JENSEN, N.E.; KNUDSEN, K. Variations in measures of udder health within a short period of time. 1. The dynamic characteristics in diagnostics of subclinical mastitis based on cytological and bacteriological parameters. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 29, p. 421-430, 1988.

KALOREY, D.R.; DHOLAKIA, P.M. Comparison of cytological methods, single radial immunodiffusion test and cultural isolation for the detection of subclinical mastitis. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v. 54, n. 10, p. 934-939, 1984.

KITCHEN, B.J.; MIDDLETON, G.; DURWARD, I.G.; ANDREWS, R.J.; SALMON, M.C. Mastitis diagnostic test to estimate mammary gland epithelial cell damage, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 6, p. 978-983, 1980.

LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.E.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.1, n.2, p. 47-52. 1981.

LASCELLES, A.K. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 1, p. 154-160, 1979.

LECCE, J.G.; LEGATES, J.E. Changes in the paper electrophoretic whey-protein pattern of cows with acute mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, p. 698-704, 1959.

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. **British Veterinary Journal**, London, v. 124, n.4, p. 358-363, 1968.

LOUZÃ, A.C.; VIEGAS, F.J.T.; BRANCO, F.N.A. Mamites subclínicas na região agrária de Ribatejo e Oeste: 1. Epidemiologia. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Ribatejo, v. 81, n. 479, p.263-285, 1986.

- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, Elmsford, n. 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. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 10, p. 113-124, 1986.
- MUNRO, G.L.; GRIEFE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **The Australian Journal of Dairy Thechnology**, Highett, v. 39, n. 1 p. 7-16, 1984.
- NADER FILHO, A.; JUNIOR, O.D.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; CEMBRANELLI, E.M. Sensibilidade da prova de whiteside na detecção de leite mastítico em nível de usina de beneficiamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 40, n.237, p. 11-14, 1985
- NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; WILSON, D.; FUKUDA, S.P. Estudo de detecção de leite mastitico em nível de usina de benefiamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n.236, p. 13-17, 1984.

NORCROSS, N.L.; Secretion and composition of colostrum and milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 181, n. 10, p. 1057-1060, 1982.

ÖSTENSSON, K. Total and differential leukocyte counts, N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity, and serum albumin content in foremilk and residual milk during endotoxin-induced mastitis in cows. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 54, n.2, p. 231-238, 1993.

OTERO, F.D.; CRUZ, J.R.S. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina en las fases de involución y lactación. **Veterinaria México**, México, v. 23, n. 4, p. 357-365, 1992.

PEREZ, M.D.; SANCHEZ, L.; ARANDA, P.; SALA, F.J.; CALVO, M. Time-course levels of α_2 -macroglobulin and albumin in cow colostrum and milk and α_2 macroglobulin levels in mastitic cow milk. **Annales de Recherches Vétérinaire**, Paris, v. 20, p. 251-258, 1989.

PERSSON, K.; CARLSSON, A.; HAMBLETON, C.; GUIDRY, A.J. Immunoglobulins, lysozyme and lactoferrin in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 39, p. 165-174, 1992.

POUTREL, B.; CAFFIN, J.P.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, p. 535-541, 1983.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation to evaluate the recovery from acute bovine mastitis. **Research Veterinary Science**, London, v. 45, p. 166-169, 1988.

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. **Annales de Recherches Vétérinaire**, Paris, v. 14, n. 3, p. 271-279, 1983.

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E.; RICHTER, R.L. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 57, n. 1, p.15-18, 1974.

ROSENBERGER, G. Úbere. In: **Exame clínico dos bovinos**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 329-341.

SAAD, A.M.; KAARTINEN, L.; ASTRÖM, G. Influence of exogenous estradiol on the concentration of antitrypsina, albumin,

N-acetyl- β -D-glucosaminidase and somatic cells in milk of cows at various lactation stages. **Journal Veterinary Medical Association**, Berlin, v. 37, p. 51-60, 1990.

SANDHOLM, M.; MATTILA, T. Biochemical aspects of bovine mastitis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Rishon Le-Zion, v. 42, n. 4, p. 405-415, 1986.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SHELDRAKE, R.F. Immune mechanisms of the ruminant mammary gland. **Australian Journal of Dairy Thechnology**, Highett, v.42, p. 30-32, 1987.

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. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, p. 542-547, 1983.

SINGH, L.H.; GANGULI, N.C. Changes in the whey protein fraction in mastitis milk, colostrum and drying off secretions. **Indian Journal Dairy Science**, New Delhi, v. 28, n. 4, p. 273-277, 1975.

SMITH, A.M.; CHESWORTH, J.M.; HENDERSON, G.D.; RODWAY, R.G. Use of laurell electrophoresis for the quantitative

measurements of albumin in mastitic milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, p. 547-550, 1979.

SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. **Mechanisms of disease** : a textbook of comparative general pathology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1982. 420 p.

VERHOEFF, J.; SMITH, J.A.H. Bovine serum albumin and cell counts in the diagnosis of subclinical udder infection. **The Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 3, n.1, p. 38-45, 1981.