

# Diagnóstico de mastites subclínicas caprinas pelo método do doseamento de Amilóide A do leite

Sequeira, A M <sup>1</sup>; Coelho, A C <sup>1</sup>; Abreu, R <sup>2</sup>; Alegria, N <sup>1</sup>; Mendonça, Á<sup>2</sup>; Quintas; H <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento das Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>2</sup>Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária, 5300-253 Bragança, Portugal; <sup>3</sup> - Centro De Investigação de Montanha (CIMO) - Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

\*Autor Correspondente: helder5ias@sapo.com



## INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A mensuração das proteínas da fase aguda da inflamação (PFA), para deteção de mastites, tem sido alvo de vários estudos em bovinos e diversos estudos comprovam um incremento na produção de haptoglobina e Amilóide A (AA) séricas em vacas com mastites clínicas e subclínicas. Apesar da reduzida literatura disponível em pequenos ruminantes, a Amilóide A sérica está indicada como a PFA mais sensível em ovinos. Recentemente foi descoberta uma isoforma específica de AA no leite de bovinos e ovinos, denominada por Amilóide A do leite. Esta é produzida pelas células epiteliais e aumenta de forma precoce em situações de mastite. Com este estudo pretendeu-se avaliar a utilidade do doseamento de Amilóide A do leite no diagnóstico de mastites em caprinos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram recolhidas amostras de cada metade mamária em 12 cabras de raça Serrana, durante 6 semanas consecutivas, no período da manhã e previamente à ordenha (n=144).

A metodologia seguida para a recolha das amostras de leite teve como base a descrita por Corrales *et al.* (1997).

A concentração de AA do leite foi determinada com o recurso a um ensaio imunoenzimático comercial (Mast ID RANGE, Milk Amyloid A Assay Kit-Tridel Development Limited, Maymoth, Irlanda; Cat No: TP-807), de acordo com as instruções do fabricante. As absorvâncias foram lidas por espectrofotometria a 450 nm tendo 630nm como referência (Gene 5<sup>o</sup> Data Analysis Software).

Com base nos resultados microbiológicos (PCA-Plate Count Agar) e da contagem de células somáticas (CCS por Fossomatic<sup>®</sup>) as metades mamárias foram divididas em 4 grupos: metades mamárias saudáveis, glândulas mamárias com mastites subclínicas e mastites subclínicas duvidosas: latentes e inespecíficas (Tabela 1).

Tabela 1- Grupos experimentais de metades mamárias.

Grupos das metades mamárias	PCA	CCS
Saudáveis	negativo	< 750 x 10 <sup>3</sup> células /ml
Inespecíficas	negativo	> 750 x 10 <sup>3</sup> células /ml
Latentes	positivo	< 750 x 10 <sup>3</sup> células /ml
Mastites subclínicas	positivo	> 750 x 10 <sup>3</sup> células /ml

A análise estatística dos dados foi realizada com o Microsoft<sup>®</sup> Excel 2010 – Microsoft Office<sup>®</sup> e JMP<sup>®</sup> versão 9.0- Statistical Software.



Figura 1- Placa de 96 poços utilizada no ensaio imunoenzimático (Mast ID RANGE, Milk Amyloid A Assay Kit).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência dos grupos experimentais definidos está resumida na seguinte tabela (Tabela 2).

Tabela 2- Ocorrência (%) dos grupos das metades mamárias.

Grupos das metades mamárias	Nº de metades mamárias	Ocorrência (%)	IC 95%
Saudáveis	51	35,42%	28,08-43,51%
Inespecíficas	56	38,88%	31,31-47,04%
Latentes	11	7,64%	4,32-13,16%
Mastites subclínicas	26	18,06%	12,63-25,14%

Os casos de mastites subclínicas latentes podem estar relacionados com contaminações cutâneas na recolha da amostra, infeções crónicas por *Staphylococcus coagulase negativas*, início ou fim da resposta inflamatória, mastites com resposta aguda de curta duração ou infeções por estirpes bacterianas de baixa patogenicidade tal como sugerido por outros autores (Miglio *et al.*, 2013).

As mastites subclínicas inespecíficas com contagens de células somáticas superiores a 750.000 células/mL podem ser atribuídas a vários fatores de natureza não infecciosa (Souza *et al.*, 2012). No entanto, estas podem ter com origem agentes que não foram isolados, devido a uma possível eliminação intermitente, à baixa concentração na amostra, ou o agente em questão não se desenvolver nas condições em que o exame bacteriológico foi realizado (Miglio *et al.*, 2013). Foram calculados a média, desvio-padrão, intervalo de confiança e a mediana da MAA para cada grupo considerado (Figura 2; Tabela 3).

Tabela 3- Medidas de variabilidade para a concentração de Amilóide A no leite nos diferentes grupos considerados.

Grupo	Média ± DP (µg/ml)	EP (µg/ml)	Mínimo (µg/ml)	Máximo (µg/ml)	IC 95 % (µg/ml)
Saudáveis	4,25 ± 3,00	0,42	1,12	17,53	3,40-5,10
Inespecíficas	11,91 ± 8,47	1,13	1,58	31,64	9,64-14,18
Latentes	5,39 ± 3,41	1,03	2,31	14,15	3,10-7,69
Mastites subclínicas	7,06 ± 4,68	0,92	1,91	26,25	5,17-8,95

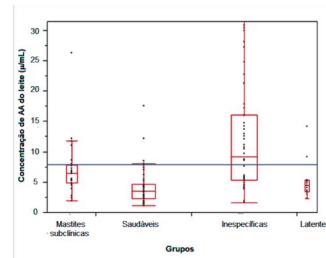


Figura 2- Diferenças nas concentrações de Amilóide A do leite dos grupos experimentais das metades mamárias.

Os valores de Amilóide A do leite das metades mamárias saudáveis variou de 3,40 a 5,10 µg/mL, já a média das glândulas mamárias com mastites subclínicas foi de 7,06 µg/mL.

Os resultados da concentração de Amilóide A do leite foram transformados para uma escala logarítmica (log<sub>e</sub>) de modo a balancear a distribuição e fazer-se a comparação entre médias pelo teste t de Student (Tabela 4).

Tabela 4- Médias das concentrações de AA do leite dos grupos de metades mamárias avaliados, em escala logarítmica. Os valores que não estão ligados pela mesma letra apresentam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Grupos	Média (µg/mL)
Inespecíficas	2,22 a
Mastites subclínica	1,81 b
Latentes	1,55 b c
Saudáveis	1,25 c

A concentração de AA do leite parece estar associada com a quantidade de ADN bacteriano da amostra.

A inexistência de diferenças significativas entre os grupos com mastites subclínicas e mastites subclínicas latentes, e entre as metades mamárias saudáveis e glândulas com mastites subclínicas latentes pode estar relacionada com o número limitado de casos de mastites latentes ou ser devida à baixa concentração de bactérias na amostra.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam o doseamento da Amilóide A do leite como uma técnica útil para distinguir metades mamárias saudáveis das que apresentam mastites subclínicas. Porém, esta distinção encontra-se condicionada pelas mastites subclínicas inespecíficas. Assim, são necessários mais estudos de forma a confirmar a utilidade desta técnica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Corrales J, Contreras A, Sanchez A, Luengo C, Marco J. Etiologia y diagnóstico microbiológico de las mastitis caprinas. *Ovis* 1997; 53: 33–65.
- Miglio A, Moscati L, Fruganti G, Pela M, Scoccia E, Valiani A, Maresca C. Use of milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes. *J. Dairy Res.* 2013; 80: 496–502.
- Souza FN, Blagitz MG, Penna CF, Della Libera A, Heinemann MB, Cerqueira MM. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Rumin. Res.* 2012; 107: 65–75.