

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ELIZABETH ERTAL BERNASKI**

**O TESTE DE GLUTARALDEÍDO E SEU USO EM BOVINOS DE LEITE**  
(The glutaraldehyde test and its use in dairy cattle)

**CURITIBA**

**2017**

**ELIZABETH ERTAL BERNASKI**

**O TESTE DE GLUTARALDEÍDO E SEU USO EM BOVINOS DE LEITE**  
(The glutaraldehyde test and its use in dairy cattle)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Prof. Dr. Rudiger Daniel Ollhoff

**CURITIBA**

**2017**

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)**

**(Entregue pela secretaria)**

## SUMÁRIO

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                                     | <b>v</b>      |
| <b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....</b>                             | <b>vi</b>     |
| <b>RESUMO GERAL.....</b>                                       | <b>vii</b>    |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>ix</b>     |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                              | <b>x</b>      |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                   | <b>xi</b>     |
| <b>CAPÍTULO 1</b>  |               |
| INTRODUÇÃO.....  | 1             |
| <b>CAPÍTULO 2</b>  |               |
| O TESTE DE GLUTARALDEÍDO E SEU USO EM BOVINOS DE<br>LEITE..... | 3             |
| RESUMO.....  | 3             |
| ABSTRACT.....  | 3             |
| INTRODUÇÃO.....  | 4             |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....                                       | 4             |
| RESULTADOS.....  | 5             |
| DISCUSSÃO.....   | 6             |
| CONCLUSÃO.....   | 7             |
| REFERÊNCIAS.....   | 8             |
| <b>CAPÍTULO 3</b>  |               |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                      | 13            |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>14</b>     |
| <b>ANEXO 1.....</b>  | <b>16</b>     |

## AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado teve a participação, importante ajuda e incentivo para que se tornasse realidade. Sempre estarei agradecida.

Primeiramente, agradeço ao Grande Criador do Universo, Deus. Por sempre ser a minha força e o meu sustento.

À minha querida família que sempre esteve ao meu lado e me apoiou em todos os momentos, à minha mãe Ingrid e ao meu pai Erolt, meus irmãos Mateus e Evelyn e meu marido Osni que sempre me incentivaram, entenderam os momentos que eu tive que me ausentar, e foram muito importantes nessa jornada. Vocês são o que eu tenho de mais precioso em minha vida.

Ao meu orientador, o Professor Dr. Rudiger Daniel Ollhoff, que sempre me apoiou e acreditou que era possível a realização desta dissertação.

À minha querida amiga Kassy, que sem a sua ajuda nada seria possível, e também agradeço a Giovanna, Luís e Mayra pelo grande apoio que sempre recebi de vocês.

Agradeço também à Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, pela sua estrutura que me auxiliou para a parte prática do projeto e aos colaboradores que estão envolvidos nos laboratórios de hematologia e bioquímica e ainda à Fazenda Galha Azul da PUCPR onde pude realizar uma parte do projeto com os bovinos presentes na leiteria.

## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, contextualização do tema, justificativa e os objetivos do estudo.

O capítulo 2 aborda a parte experimental desta dissertação em formato de artigo de uma revista científica. Encontra-se no formato exigido pela Pesquisa Veterinária Brasileira.

O Capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

A detecção de alguns processos inflamatórios (PI) nos bovinos é um desafio para os clínicos a campo. O teste de glutaraldeído (TG), um exame que indica a presença de PI pela rapidez de coagulação do sangue bovino, simples e rápido, realizado durante o exame físico, objetiva superar esta dificuldade. Com o presente estudo verificou-se a eficácia do teste de glutaraldeído (TG) em detectar e predizer PI tanto leves (PIL) quanto graves (PIG), classificados segundo o diagnóstico clínico de diferentes doenças na espécie bovina. O experimento foi realizado com 176 fêmeas bovinas, com idade  $\geq 12$  meses, realizando-se o exame físico (frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC), frequência de movimentos ruminais (MR), temperatura corpórea via retal (TR), condição corporal (EC), escore de locomoção (EL), exames de sangue e bioquímicos (hematócrito (HT), proteína total (PT), albumina (ALB), globulina (GLO), relação albumina/globulina (ALB/GLO) e fibrinogênio (FIB)), além do TG em quatro categorias. A idade média dos bovinos foi próxima de quatro (3,93) anos, a um máximo de 13 anos. Os animais classificados como PIG ( $n=57$ ) obtiveram média de FR maior, claudicavam mais e eram mais velhos do que os animais classificados como PIL ( $n=119$ ;  $p \leq 0,05$ ), porém não diferiram na TR. O TG foi consideravelmente mais rápido ( $p \leq 0,0001$ ) no grupo PIG (6min20s $\pm$ 4min19s) comparado ao grupo PIL (9min42s $\pm$ 4min25s). A FR com um valor de  $\rho = -0,5185$  e o EL  $\sigma = -0,3377$  ( $p < 0,0001$ ) correlacionaram-se de forma moderada a fraca com o TG. Os MR, a FC e a TR não tiveram influência sobre o TG. Observou-se uma correlação positiva do HT em relação ao TG ( $\rho = 0,4591$ ;  $p < 0,0001$ ). Outras correlações observadas foram a ALB, a GLO e a relação ALB/GLO com correlações respectivamente de  $\rho = -0,4212$  ( $p < 0,0001$ ),  $\rho = 0,2106$  ( $p = 0,005$ ) e  $\rho = -0,3537$  ( $p < 0,0001$ ). Quanto maior é o FIB menor é o tempo no TG ( $\rho = -0,3356$ ;  $p < 0,0001$ ). O TG obteve sensibilidade de 66,7 %, especificidade de 74,8 %, valor preditivo positivo de 55,9 % e um valor preditivo negativo de 82,4 %. O TG demonstrou ser um valioso método para detecção de PI em 10,80 % das vacas consideradas saudáveis pelo exame físico, sendo que exames laboratoriais confirmaram alterações *a posteriori* em 8,52 % das vacas. O TG constitui uma ferramenta de auxílio diagnóstico capaz de detectar corretamente os PI mais graves nas condições de campo, pela sua rapidez e facilidade de aplicação durante o exame em bovinos.

**Palavras-chave:** Bovino, Teste de Glutaraldeído, Processo Inflamatórios, Diagnóstico.

## ABSTRACT

The detection of some inflammatory processes (IP) in cattle is a challenge for clinicians in the field. The glutaraldehyde test (GT), a simple and rapid blood test performed during physical examination of the bovine which evaluates IP based on speed of blood coagulation, aims to overcome this difficulty of the veterinarian. With the present study, we verified the efficacy of the glutaraldehyde test (GT) in detecting and predicting both mild (MIP) and severe (SIP) inflammatory processes, classified according to the clinical diagnosis of different diseases in cattle. The experiment was carried out with 176 female cattle, aged  $\geq 12$  months, performing physical examination (respiratory rate (RR), heart rate (HR), frequency of ruminal movements (RM), rectal body temperature (RT), body condition (BC), locomotion score (LS)); blood and biochemical evaluation (hematocrit (HT), total plasmatic protein (TPPT), albumin (ALB), globulin (GLOB), albumin/globulin relation (ALB/GLO) and fibrinogen (FIB) in addition to GT in four categories. The mean age of cattle was close to four (3,93) years, with a maximum of 13 years. The animals classified as SIP ( $n = 57$ ) had a higher mean RR, claudicated more and were older than the animals classified as MIP ( $n=119$ ;  $p\leq 0,05$ ), but did not differ in the RT. GT was also considerably faster ( $p\leq 0,0001$ ) in the SIP group (6min20s $\pm$ 4min19s) compared to the MIP group (9min42s $\pm$ 4min25s). By checking the correlations, the RR with a value of  $\rho=-0,5185$  and the LS  $\sigma=-0,3377$ , ( $p<0,0001$ ) had a moderate to weak correlation with the GT. RM, HR and RT had no influence on GT. There was a positive correlation between HT and GT ( $\rho=0,4591$ ,  $p<0,0001$ ). Other correlations observed were ALB, GLO and ALB/GLO with correlations respectively  $\rho=-0,4212$  ( $p<0,0001$ ),  $\rho=0,2106$  ( $p=0,005$ ) and  $\rho=-0,3537$  ( $p<0,0001$ ). The higher the FIB the lower the time in the GT ( $\rho=-0,3356$ ,  $p<0,0001$ ). The TG obtained a sensitivity of 66.7%, a specificity of 74.8 %, a positive predictive value of 55.9 % and a negative predictive value of 82.4 %. GT was a valuable instrument for IP detection in 10,80% of cattle considered healthy by physical examination, with laboratorial tests confirming alterations *a posteriori* in 8,52% of the animals. GT is a diagnostic aid, able to correctly detect the most serious IP in the field conditions due to its speed and ease of application during examination of dairy cattle.

**Keywords:** Bovine, Glutaraldehyde Test, Inflammatory Process, diagnosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| ALB     | Albumina  |
| ALB/GLO | Relação de Albumina com Globulina                 |
| EDTA    | Anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| EC      | Escore Corporal                                   |
| EL      | Escore Locomotor                                  |
| FC      | Frequência Cardíaca                               |
| FIB     | Fibrinogênio                                      |
| FR      | Frequência Respiratória                           |
| GLO     | Globulina   |
| HT      | Hematócrito                                       |
| MR      | Frequência de Movimentos Ruminais                 |
| min     | Minutos   |
| PI      | Processo Inflamatório/Processos inflamatórios     |
| PIG     | Processo Inflamatório Grave                       |
| PIL     | Processo Inflamatório Leve                        |
| PPT     | Proteínas Plasmáticas Totais                      |
| s       | Segundos  |
| TR      | Temperatura Retal                                 |
| TG      | Teste de Glutaraldeído                            |
| TG1     | Teste de Glutaraldeído da Categoria 1             |
| TG2     | Teste de Glutaraldeído da Categoria 2             |
| TG3     | Teste de Glutaraldeído da Categoria 3             |
| TG4     | Teste de Glutaraldeído da Categoria 4             |
| VPN     | Valor Preditivo Negativo                          |
| VPP     | Valor Preditivo Positivo                          |

## LISTA DE QUADROS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Quadro 1.</b> Categorias de interpretação do teste de coagulação do glutaraldeído e classificação de processo inflamatório em bovinos, adaptado de Doll <i>et al.</i> (1985).<br>.....  | 10     |
| <b>Quadro 2.</b> Classificação dos bovinos segundo sua avaliação física em processo inflamatório (PI) leve/saudáveis (PIL) e grave (PIG) com o respectivo número de animais, frequência relativa, tempo médio e desvio padrão obtidos no teste de glutaraldeído graduado em categorias de 1 a 4..... | 10     |
| <b>Quadro 3.</b> Comparação da média e desvio padrão das categorias do teste de glutaraldeído graduado de 1 a 4 em relação aos valores de idade (anos), frequência respiratória (FR/min), temperatura retal (TR/°C) e mediana do escore de locomoção (EL) nos bovinos.....                           | 11     |
| <b>Quadro 4.</b> Comparação da média e desvio padrão das categorias do teste de glutaraldeído dos bovinos com os valores do hematócrito (HT), proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina (ALB), globulina (GLO), relação albumina e globulina (ALB/GLO) e fibrinogênio (FIB) .....                 | 11     |
| <b>Quadro 5.</b> Classificação das vacas no TG divididas em doentes e saudáveis para as fórmulas de Sensibilidade, especificidade e valor preditivo do teste de glutaraldeído para bovinos de leite adultos (n=176) .....  | 12     |
| <b>Quadro 6.</b> Sensibilidade, especificidade e valor preditivo do teste de glutaraldeído para bovinos de leite adultos (n=176) .....   | 12     |

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A boa saúde dos animais está relacionada à genética, ao ambiente, à alimentação, ao manejo e ao dia-a-dia da gestão da propriedade. Qualquer alteração nesses fatores pode ocasionar distúrbios fisiológicos, passíveis de desencadear doenças (Rodriguez-Ledesma et al. 2015). Tanto as doenças infecciosas, quanto as traumáticas, desencadeiam processos inflamatórios (PI) no organismo animal (Medzhitov 2008).

Para o diagnóstico, além do exame físico, existem ferramentas auxiliares importantes que são a hematologia e a bioquímica clínica. Devem ser usadas juntamente com outros dados do exame clínico no diagnóstico de inflamações inaparentes nos bovinos, assim como também o monitoramento de pacientes em tratamento ou sob observação, aumentando a confiabilidade do diagnóstico (Dirksen et al.1993, González 2009). Na rotina clínica, para o diagnóstico e prognóstico de PI agudos ou crônicos classicamente são mensurados o fibrinogênio (hiperfibrinogenemia) e as globulinas (hiperglobulinemia) no sangue (Dirksen et al. 1993, Fürll 2005). Mais recentemente acrescentaram-se a estes exames clássicos a avaliação da resposta inflamatória pelas proteínas da fase aguda, como a ceruloplasmina, a haptoglobina e o amilóide sérico A (Murata et al. 2004), que se mostraram biomarcadores confiáveis e precoces, por exemplo, nos bovinos com mastite estafilocócica e onfaloflebites (Simplício et al. 2013).

No entanto, assim como o exame do fibrinogênio e das globulinas, a mensuração de proteínas de fase aguda da inflamação requer o uso de aparelhagem específica e execução em ambiente laboratorial.

O TG baseia-se na coagulação induzida do sangue total colhido com anticoagulante, mais especificamente das frações amina do fibrinogênio em conjunto com as globulinas e os terminais aldeído do glutaraldeído (Liberg et al. 1978). Doll et al. (1985) utilizaram desde a década de 80 do século passado o TG em bovinos, mensurando visualmente o tempo de coagulação do sangue e correlacionando-o a diferentes doenças. Kováč et al. (1987) usaram o TG para auxiliar na tomada de decisão para instituir ou não um tratamento em bovino. O teste é conhecido pelo menos desde a década de 90 no Brasil, por ter sido

publicado em livro texto de ampla difusão e uso nas escolas de medicina veterinária brasileiros (Dirksen et al. 1993). Apesar disto, o teste foi usado no Brasil, segundo a literatura consultada, somente por Charles et al. (1994) para a verificação da ingestão de colostro pelos bezerros. O teste não foi bem-sucedido para esta finalidade.

Mais tarde Brink et al. (2005) utilizaram o TG também em equinos. O TG em equinos não teve correlação com os valores de fibrinogênio, porém houve correlação positiva com globulinas. O TG foi considerado útil pelos autores como teste de seleção prévia com o intuito de distinguir entre PI agudos e crônicos.

Mais recentemente em bovinos, Metzner et al. (2007) examinaram detalhadamente a cinética do TG na detecção de PI. Sete dias foi o menor intervalo encontrado entre o teste negativo (coagulação acima de 15 minutos) e um resultado fortemente positivo (coagulação < 3 minutos). Por outro lado, um bovino com resultado no TG fortemente positivo necessitou ao menos 21 dias para se tornar negativo novamente. Os autores ressaltaram a necessidade de usar o TG dentro do contexto de cada quadro clínico.

O TG foi usado especificamente em algumas situações problemas do bovino como nas peritonites e reticuloperitonites (Liberg et al. 1981, Doll et al. 1985) e na claudicação (Nechanitzky et al. 2016). Nas peritonites o TG foi útil para identificar os animais acometidos e distinguir entre PI crônicos (>7 dias) e agudos (< 7 dias), no entanto, o TG não conseguiu distinguir vacas claudicantes de sadias.

O TG é um exame barato, de fácil e rápida execução e realização ao lado do animal durante o exame físico. Pode detectar PI internos dos bovinos às vezes de difícil reconhecimento durante exames rotineiros (Doll et al. 1985, Metzner et al. 2007). Estas características o qualificam para seu uso e aplicação no exame clínico do bovino a campo. No entanto, no Brasil até o presente momento, não encontrou-se artigos aplicando o TG em bovinos adultos.

O objetivo do presente estudo visa a dirimir esta lacuna, contribuindo para o conhecimento a respeito das aplicações do TG em condições a campo brasileiras, distinguindo os PI leves e graves e entre os bovinos adultos saudáveis e doentes.

## CAPITULO 2

(Artigo científico submetido para publicação no periódico Pesquisa  
Veterinária Brasileira)

### O teste de glutaraldeído e seu uso em bovinos de leite <sup>1</sup>

Elizabeth E. Bernaski<sup>2</sup>, Kassy G. da Silva<sup>2</sup>, Giovanna Polo<sup>2</sup>, Saulo H. Weber<sup>2</sup>, Ivan R. de Barros Filho<sup>3</sup>, R. Daniel Ollhoff<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Bernaski E. E., Silva K. G., Polo G., Weber S. H., Barros Filho I. R., Ollhoff R. D. 2018. [**The glutaraldehyde test and its use in dairy cattle.**] O teste de glutaraldeído e seu uso em bovinos de leite. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PPGCA-PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR 80215-901, Brasil. E-mail: [ollhoff@gmail.com](mailto:ollhoff@gmail.com)

Inflammatory processes in cattle, especially when they occur in deeper tissues, are difficult to evaluate during physical examinations. Moreover, only a few biochemical tests that help the clinician determine the diagnosis and prognosis can be used in the field. The glutaraldehyde test (GT), using a whole blood sample, allows the visual and semiquantitative identification of the inflammatory process in cattle. Considering that there are few biochemical tests that can be applied in the field, this study aimed to verify the efficacy of GT in detecting and predicting mild and severe inflammatory processes classified according to the physical examination and in the presence of different diseases or lesions in dairy cattle. GT was applied together with physical examination of 176 cows over 12 months old, in addition to the laboratory evaluation of the hematocrit, total protein, albumin, globulin, and fibrinogen. The GT achieved a sensitivity of 66.7%, a specificity of 74.8%, a positive predictive value of 55.9% and a negative predictive value of 82.4% with a cut-off point of three minutes coagulation time. GT could accurately detect the most serious inflammatory processes affecting cows under field conditions. The test is a diagnostic aid and can be used as a screening tool due to its speed and ease of use during examination of cattle.

INDEX TERMS: Bovine, Glutaraldehyde Test, Inflammatory Process, diagnosis.

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PPGCA-PUCPR), Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, Curitiba, PR 80215-901, Brasil. \*Autor para correspondência: [ollhoff@gmail.com](mailto:ollhoff@gmail.com).

<sup>3</sup> Professor adjunto da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Setor de Ciências Agrárias, Juvevê, Curitiba, PR 80035-050, Brasil.

**RESUMO.-** Processos inflamatórios no bovino, principalmente quando ocorrem em regiões mais profundas, são difíceis de avaliar no exame físico. O teste de glutaraldeído (TG), realizado com uma amostra de sangue total, possibilita a identificação visual e semiquantitativa de um processo inflamatório no bovino. Ao considerar que existem poucos testes bioquímicos passíveis de aplicação a campo, esse estudo objetivou verificar a eficácia do TG em detectar e prever os processos inflamatórios leve e grave classificados conforme o exame físico e na presença de diferentes doenças ou lesões na espécie bovina. O TG foi aplicado juntamente com o exame físico em 176 fêmeas bovinas acima de 12 meses, além da avaliação laboratorial do hematócrito, proteína total, albumina, globulina e fibrinogênio. O TG obteve sensibilidade de 66,7 %, especificidade de 74,8 %, valor preditivo positivo de 55,9 % e valor preditivo negativo de 82,4 % com o ponto de corte em 3 minutos de coagulação. O TG foi capaz de detectar corretamente os processos inflamatórios mais graves nas condições de campo deste estudo. O teste constitui um recurso de auxílio diagnóstico, podendo servir como triagem pela sua rapidez e facilidade de aplicação durante o exame em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vaca, Teste de Glutaraldeído, Processo Inflamatórios, Diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

Tanto as doenças infecciosas, quanto as traumáticas, desencadeiam processos inflamatórios (PI) no organismo animal (Medzhitov 2008). Reconhecer a ocorrência da inflamação e determinar o prognóstico, pode tornar-se difícil para o médico veterinário clínico, especialmente se o processo estiver em um estágio crônico e requer decisões sobre uma possível eutanásia (Doll et al. 1985).

Para auxiliar no esclarecimento dos achados encontrados durante o exame físico, na suspeita de PI, exames complementares são necessários para aumentar a confiabilidade do diagnóstico (Doll et al. 1985). O exame laboratorial é um importante complemento ao exame físico, compondo o quadro clínico, auxiliar na elaboração do diagnóstico e prognóstico (Dirksen et al. 1993). No entanto, tais exames exigem equipamentos muitas vezes dispendiosos e condições laboratoriais, portanto não são aptos para serem aplicados na rotina de um médico veterinário de bovinos a campo. Evidencia-se com isso a utilidade de um teste de rápida execução, como o teste de glutaraldeído (TG), realizado durante o exame clínico do bovino. O TG pode proporcionar uma confirmação rápida para uma suspeita de um PI (Doll et al. 1985, Kováč et al., 1987, Brink et al. 2005, Metzner et al. 2007). A vantagem logística e econômica comparativa pelo não encaminhamento de amostras de tecido a um laboratório de análises clínicas fica evidente (Liberg 1978, Brink et al. 2005).

O TG baseia-se na capacidade do glutaraldeído em soluções diluídas ligar-se às proteínas, na dependência da quantidade e disposição estrutural dos grupos amina livres, formando uma rede intermolecular com formação macroscópica de um gel (Sandholm 1974). O tempo desta reação química é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio e de imunoglobulinas (Brink et al. 2005).

O diagnóstico aprimora o prognóstico, que por sua vez direciona as possibilidades de intervenção terapêutica, custo e efetividade do tratamento, ressaltando a utilidade do TG principalmente em animais em sistemas de produção (Doll et al. 1985, Brink et al. 2005). Respostas inflamatórias insignificantes e doenças em estágios iniciais podem resultar em TG negativo (Doll et al. 1985). Segundo Metzner et al. (2007), um bovino adulto torna-se positivo no TG decorridos, no mínimo, 7 dias, e novamente negativo com o mínimo de 21 dias.

No Brasil, o TG foi somente usado, até o presente momento, em bezerros, aproveitando-se a capacidade de reação com imunoglobulinas, visando-se a avaliação do grau de transferência de imunoglobulinas pelo colostro (Charles et al. 1994). Tyler et al. (1996) consideraram a sensibilidade e a especificidade inadequadas para o uso do TG como monitoramento da transferência passiva de imunoglobulinas em bezerros. Apesar de seu uso em alguns países europeus (Liberg 1978, Doll et al. 1985, Kováč et al. 1987, Brink et al. 2005, Metzner et al. 2007), não se encontraram, na literatura nacional consultada relatos do uso do TG com a finalidade de detecção de processos inflamatórios relacionados a enfermidades bovinas no Brasil.

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o uso do TG como método auxiliar do exame clínico no bovino adulto nas condições brasileiras, visando testar a sua eficácia em detectar os PI (leve e grave), distinguindo entre vacas doentes e saudáveis.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado com fêmeas bovinas lactantes e não-lactantes das raças Holandesa, Jersey e mestiças das raças anteriores, com idade superior a 12 meses e com o máximo de 13 anos, mantidas em sistemas de manejo diferentes, intensivo e semi-intensivo, em duas propriedades leiteiras localizadas nos municípios de Lapa e Fazenda Rio Grande, Paraná. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética em uso de animais (CEUA) sob o número 984A/2015 em 24 de setembro de 2015.

As avaliações consistiram em exame físico, exames laboratoriais e o teste de glutaraldeído (TG). O exame físico (Dirksen et al. 1993) incluiu aferição de: frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC), frequência de movimentos ruminais (MR), temperatura corpórea via retal (TR), inspeção de lesões de integridade da pele ou subcutâneo, presença de ectoparasitas e a condição corporal (EC). Acrescentou-se ainda o escore de locomoção (EL) segundo Sprecher et al. (1997), com variação dos escores de 1 a 5, sendo o grau 1 como não claudicante e o grau 5, com claudicação grave e relutância em apoiar o membro afetado. As vacas avaliadas foram classificadas segundo o exame físico em casos com sintomatologia condizente com processo inflamatório grave (PIG) (ex. mastites, pneumonias, ferimentos profundos), ou leve/saudáveis no exame físico (PIL) (pouca evidência de inflamação ex. presença de poucos bernês localizados, ferimento de pele superficial). Utilizou-se o termo PIL ao invés de saudável, pois os exames físicos foram realizados com extrema acuidade, quase sempre se encontrando algum tipo de ferida de pele nos animais.

Para os exames laboratoriais e o TG, três amostras de sangue foram colhidas de vasos da cauda (coccígeo), sendo uma imediatamente utilizada para o TG, e as outras armazenadas em tubos

com EDTA e sem anticoagulante, para mensuração da albumina (ALB), do hematócrito (HT), das proteínas totais (PT), e do fibrinogênio (FIB). As globulinas foram mensuradas por meio de cálculo resultante da subtração do valor da albumina (ALB) das proteínas plasmáticas totais (PPT). Calculou-se igualmente a relação ALB/GLO. A ALB foi mensurada por meio do método de verde de bromocresol (com kit comercial Albumina PP, Gold Analisa Diagnóstico®, Brasil) e a leitura em espectrofotometria (Bioplus Bio-2000®, Brasil). No plasma foram mensurados o HT, as PPT (por refratometria) e o fibrinogênio (pelo método de precipitação por calor segundo Thrall 2007).

Para a realização do TG preparou-se a solução com: 50 ml de Glutaraldeído 25%, 1g de Na<sub>2</sub>-EDTA, e 1 litro de solução de NaCl 0,9% (Solução fisiológica). Os itens acima foram misturados de forma homogênea e mantidos em vidros escuros para a melhor conservação. Para o teste colheram-se 2 mL de sangue e misturaram-se com 2 mL da solução de glutaraldeído descrita anteriormente em tubo de coleta com anticoagulante (K<sub>2</sub>-EDTA) (Doll et al. 1985). Executou-se a observação do TG em tempo máximo de 15 minutos ou até a ocorrência da coagulação (Doll et al. 1985). Com o auxílio de cronômetro digital registrou-se o tempo e os resultados foram classificados de 1 a 4, conforme os critérios apresentados no quadro 1.

Os dados do exame físico (FR, FC, MR, TR, inspeção de lesões de integridade da pele ou subcutâneo e presença de ectoparasitas) (Dirksen et al. 1993) e dos exames laboratoriais (ALB, PPT, GLO, FIB, HT) foram usados para compor um quadro do estado de saúde do bovino. Foram considerados como valores fisiológicos bioquímicos os descritos por Kaneko et al. (2008).

Foram calculados os valores da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) conforme Kawamura (2002). Para os cálculos desses fatores, foram considerados os seguintes critérios: se o exame físico e/ou o exame laboratorial de um animal foram sugestivos de PI (ex. febre e aumento de FIB), considerou-se que este devesse reagir ao TG. Para o cálculo de S e E considerou-se como ponto de corte o resultado em até 3 minutos (categoria 1 no TG). Discrepâncias foram consideradas ou falsos negativos (TG em categorias 2, 3 ou 4, com sintomatologia condizente com PI grave) ou falso positivos (TG em categoria 1, mas sem sintomatologia condizente com PI grave).

Para a análise estatística dos dados em um nível de confiança de 95% usou-se o *software* Statgraphics® Centurion XVI, versão 16.1.11. Para as variáveis quantitativas usou-se correlações de Pearson e para as variáveis qualitativas correlação de Spearman. Além disso foi utilizado o *software* estatístico GraphPad Prism® versão 5.00, San Diego – Califórnia, EUA. Para os grupos do TG usou-se o teste ANOVA e para os dados não-paramétricos o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunns ou teste de Tukey (dados paramétricos). Para os grupos PIL e PIG realizou-se o teste t de Student e para não paramétricos o teste de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

Dos 176 bovinos examinados, 119 bovinos foram classificados no exame físico como PIL e o tempo médio para o TG foi de 9 minutos e 42 segundos. Como PIG foram classificadas 57 animais com o tempo médio no TG de 6 minutos e 20 segundos. Foram encontradas lesões diversas de integridade da pele (25 bovinos), 36 feridas de pele provocadas por larvas da *Dermatobia hominis* (berne), 20 animais apresentavam corrimento vaginal fétido ou retenção de placenta, 5 vacas com mastite catarral aguda e 23 animais com outras alterações, tais como deslocamento de abomaso, fratura de costela, corrimento nasal purulento, lesão traumática de jarrete, laminite, pontos cirúrgicos inflamados e infeccionados. Nove bovinos apresentavam mais de um tipo de lesão.

A aplicação do TG a campo não apresentou dificuldades práticas.

A classificação dos bovinos segundo seu resultado no TG e o exame físico encontra-se no quadro 2.

A idade média dos bovinos foi de aproximadamente quatro anos (3,93), com um máximo de 13 anos. A classificação do exame físico e a idade, com as categorias do TG podem ser verificados no quadro 3.

Tanto a FR com um valor de  $\rho = -0,5185$  ( $p < 0,0001$ ), quanto o EL  $\sigma = -0,3377$ , ( $p < 0,0001$ ), tiveram uma correlação moderada a fraca com as categorias do TG. Os MR situaram-se em média em  $2,93 \pm 0,90$  por dois minutos, a FC em  $81,57 \pm 13,79$  batimentos/minuto e não foram listados no quadro 3 por não apresentarem diferenças significativas entre as categorias e grupos.

A claudicação foi detectada através do TG com um  $\rho = -0,3377$  ( $p < 0,0001$ ). O grau 1 do EL (n=67 bovinos) obteve média de 9min46s no TG; o grau 2 do EL (n=49 bovinos) com média de 9min12s no TG; o grau 3 (n=41 bovinos) com 7min39s; e o grau 4 (n=18 bovinos) com média de 5min56s no TG. No último grau (5) do EL apenas um bovino apresentou um TG de 2 minutos.

Nas análises laboratoriais e de bioquímica sanguínea, observou-se correlação positiva do HT em relação ao TG ( $\rho = 0,4591$ ,  $p < 0,0001$ ). Outras correlações observadas foram a ALB, a GLO e a relação ALB/GLO com correlações respectivamente de  $\rho = -0,4212$  ( $p < 0,0001$ ),  $\rho = 0,2106$  ( $p = 0,005$ ) e  $\rho = -0,3537$  ( $p < 0,0001$ ). O menor tempo do TG dos grupos 1 e 2 indicaram valores maiores de FIB ( $540,74 \pm 164,69$  e  $436,58 \pm 154,52$ , respectivamente) (Quadro 4). Quanto maior é o FIB menor é o tempo no TG ( $\rho = -0,3356$ ,  $p < 0,0001$ ).

Considerando-se o exame físico como padrão e um ponto de corte de até 3 minutos no TG, foi possível calcular a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo do teste, demonstrados nos quadros 5 e 6.

## DISCUSSÃO

Considerando a saúde, em uma definição simplista, como a ausência de doença e a “boa saúde” como um dos princípios do bem-estar dos bovinos (de Vries et al. 2011), constatamos que nos rebanhos observados os bovinos, em última análise, não gozam de uma saúde plena. Através do exame clínico tivemos que optar por classificar os animais em dois grupos com algum tipo de PI, apesar da maior parte (67,6 %) terem sido classificados como PIL, porém com expressivos quase um terço dos animais no grupo PIG. Apesar de serem rebanhos escolhidos por conveniência, refletem boa parte dos rebanhos leiteiros especializados encontrados no Paraná. Esta primeira constatação revela o potencial de oportunidade que ainda existe, em se melhorando a saúde dos nossos rebanhos, em alcançarmos índices de produtividade maiores, talvez condizentes com a qualidade genética observada nos rebanhos paranaenses (Paula et al. 2009).

O TG distinguiu corretamente entre PIL e PIG, apesar do desvio padrão elevado (Quadro 2). Segundo Metzner et al. (2007), nos processos graves haveria alterações principalmente dos valores de FIB e de um componente das globulinas, a gamaglobulina. Diferenças significativas foram encontradas no FIB nos bovinos deste trabalho, porém não se verificou esta mesma diferença nas GLO com uma média encontrada nestas de 4,6 g/dL. Esta média foi, no entanto, cerca de 60 % maior que a média encontrada nas vacas de leite alemãs com 2,87 g/dL (Metzner et al. 2007). Supõe-se que a maior interação com o ambiente imunológico mais hostil nas condições brasileiras, com elevada presença de doenças infectocontagiosas, a exemplo da leucose (Meirelles et al. 2009) e ectoparasitárias (Zimmer et al. 2010, Álvarez et al. 2013) contribuam para este resultado.

Animais com uma idade maior possuem o sistema imune, que foi desafiado mais frequentemente e isto o torna melhor preparado e mais reativo aos diferentes desafios ambientais (Devery-Pocius & Larson, 1983, Canavessi et al. 2000). Aparentemente esta observação pode ser corroborada pelos resultados obtidos com o TG. Os resultados com o TG em condições brasileiras, confirmam achados anteriores de Doll et al. (1985), que observaram reações fortemente positivas para o TG em bovinos com idade superior a 6 anos.

No exame físico a FR, principalmente em vacas adultas, foi um parâmetro sensível o suficiente para detectar pequenos problemas de fundo inflamatório que passam despercebidos em uma inspeção realizada de maneira mais superficial (Dirksen et al. 1993). Igualmente, no Brasil, costuma-se valorizar muito o aumento de FR relacionando-a a estresse térmico (Perissinotto et al. 2009). O TG revela, no entanto, uma maior importância de processos inflamatórios, o que pode inclusive ser justificado por características anatômicas do pulmão bovino e a criação mais intensiva de vacas de leite, facilitando a propagação de agentes respiratórios infecciosos (Valarcher & Hägglund 2006).

A temperatura corporal, apesar de comumente ser usada no exame físico para a detecção de processos infecciosos, não foi um fator de evidente diferenciação quando considerado o TG. O sistema de regulação térmica reage muito mais rapidamente a endo-toxinas, comparado às mudanças necessárias para a detecção pelo TG, sendo que um mínimo de sete dias foi necessário para o resultado positivo (Metzner et al. 2007).

Ao contrário de Nechanitzky et al. (2016), conseguiu-se verificar o tempo de coagulação mais rápido em vacas com claudicação do que em animais sem claudicação. Provavelmente, o pequeno número de animais usados por Nechanitzky et al. (2016) como controle, dez em um total de 42 vacas examinadas, tenha contribuído para esta diferença, comparado com o presente estudo, com 67 vacas sem claudicação comparadas com 109 com algum grau de EL  $\geq 2$ . Diversos processos no locomotor distal causam consideráveis processos inflamatórios locais ou ascendentes, como os flegmões interdigitais, as artrites e as tendovaginites (Greenough 1997). Quando processos inflamatórios mais superficiais como as dermatites digitais e interdigitais são complicados por miíases, comuns no Brasil, o TG irá reagir de acordo. Portanto, o TG pode ser usado também para identificar animais com claudicações.

A correlação observada entre o TG e o HT, pode indicar a importância que os hemoparasitas, tanto os ectoparasitas quanto enfermidades como a anaplasmoze, possuem (Bernardo et al. 2016).

O TG acusou animais com elevação nos valores de FIB, apesar da correlação não ser forte ( $\rho=-0,3356$ ) (Doll et al. 1985, Metzner et al. 2007) corroborando achados de Brink et al. (2005) obtidos em cavalos. O bovino é uma das espécies de animais domésticos com uma das maiores capacidades de depositar fibrina ao redor de processos infecciosos-inflamatórios, o que somente em casos crônicos e graves leva à depleção das reservas de FIB. Por outro lado, animais com enfermidades graves (ex. peritonites, pericardites, pneumonia) possuem valores de FIB acima de 800mg/dL (McSherry et al. 1970). Este pode ser o motivo de não ter sido acusada a diferença dos valores de FIB observados entre o grupo PIL e PIG. Ressalte-se, no entanto, que os valores médios encontrados em ambos os grupos são parecidos com um grupo de vacas claudicantes (média de 397mg/dL) e de bovinos saudáveis (140mg/dL) encontrados por Bagga et al. (2016), condizente com a observação de elevado número de animais claudicantes nos dois rebanhos.

Apesar de não se terem encontradas diferenças significativas entre os grupos PIL e PIG nas concentrações de GLO e FIB, um valor bioquímico mais abrangente, como as PPT foi maior no grupo PIG, compatível com inflamações graves (Dirksen et al. 1993).

Os níveis baixos de ALB nos animais mais saudáveis (grupos TG 3 e 4) foi um achado surpreendente, pois níveis baixos de ALB eram esperados justamente nas inflamações mais graves (TG 1 ou 2), ou em casos de doenças hepáticas, ingestão alimentar intensamente reduzida (Fürl 2005) ou perda de ALB ocasionada por parasitismo (González & Silva 2017). Porém, estas condições clínicas teriam que ter correspondência com igualmente níveis baixos de PPT e o HT, o que não ocorreu. Vacas no periparto, criadas em condições brasileiras têm apresentado níveis baixos de ALB (Birgel Junior et al. 2003, Alvarenga et al. 2017), abaixo de valores de referência adotados internacionalmente (Fürl 2005, Smith 2009), o que levou Alvarenga et al. (2017) a sugerirem a adoção de valores de referência nacionais mais baixos ao menos nesta fase. Ressalte-se que não foram detectadas diferenças significativas quando comparados os grupos PIL e PIG quanto à ALB. Apesar de encontrar-se a relação ALB/GLO relativamente baixa comparada a outro trabalho nacional (Ferreira et al. 2001), não houve nenhuma relação deste achado com o TG.

A sensibilidade diagnóstica de um sinal ou resultado de um teste, colocado em relação a uma enfermidade, neste estudo o PIL ou PIG, corresponde a aquela porção dos indivíduos com o teste positivo e acometidos (Dirksen et al. 1993, Kawamura 2002). Esta ficou média com 66,7%. O TG apresentou valor de especificidade um pouco melhor, acima de 74 %. O VPN acima de 75 % pode ser considerado um bom resultado para um teste simples e barato executado a campo. O valor preditivo positivo calculado de aproximadamente 74 % ficou abaixo do valor obtido por Doll et al. (1985) de 97 %, decorrente provavelmente da situação onde o teste foi aplicado por Doll et al. (1985), de processos mais graves que os vistos no presente estudo.

Apesar da especificidade maior que a sensibilidade, o TG parece identificar com a mesma certeza os indivíduos realmente doentes, com um PI (VPP) e os realmente saudáveis, sem um PI (VPN), quando usado o tempo limite de 3 minutos. O estudo de Metzner et al. (2007) com o uso do TG, revelando que os bovinos levam quase três vezes mais tempo para ficar negativo, após o término de um processo inflamatório, pode ser comprovado em nossas condições, onde igualmente os falsos positivos (com 37 animais) foram proporcionalmente mais frequentes que os falsos negativos (com 7 animais). Os mesmos autores também verificaram falsos positivos em vacas saudáveis, após o parto. A especificidade e o VPP, contribuem para que o teste possa ser usado como um teste de triagem eficiente, o que efetivamente ocorre por exemplo na Alemanha em exames clínicos a campo (Starke 2017).

Apesar do TG constituir-se um teste de simples execução, e ter sido referenciado desde a década de 1990 por Dirksen et al. (1993), vale ressaltar que somente agora foram realizados testes a campo usando-o em larga escala para detecção de PI em bovinos adultos.

## CONCLUSÕES

O TG foi capaz de detectar corretamente os processos inflamatórios mais graves nas condições de campo deste estudo.

O TG deve ser interpretado como exame complementar ao exame físico.

O TG constitui um recurso de auxílio diagnóstico, podendo servir como triagem pela sua rapidez e facilidade de aplicação durante o exame em bovinos suspeitos de sofrerem alguma doença inflamatória sob condições de campo brasileiras.

O quanto infecções crônicas e latentes interferem no TG deverá ser averiguado em estudos futuros.

#### REFERÊNCIAS

- Alvarenga P.B., Rezende A.L., Justo, F.B., Rezende S.R., Cesar J.C.G., Santos M. R.; Mundim A. V.; Saut J. P. E. 2017. Perfil metabólico de vacas Jersey clinicamente saudáveis. *Pesq. Vet. Bras.* 37(2): 195-203.
- Álvarez J.A.C., Vergara J.C.M., Villadiego F.A.C., Martínez R.D.B., León V.E.G. 2013. Frecuencia de dermatobiosis cutánea bovina en vacas Holstein de un hato lechero en Viçosa (MG, Brasil). *Revta. CES Med. Vet. Zootec.* 8(1): 82-94.
- Bagga A., Randhawa S.S., Sharma S., Bansal B.K. 2016. Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Vet. World.* 9(11): 1204-1208.
- Bernardo F.D., Conhizak C., Ambrosini F., Neto Silva A.F., Freitas F.L.C, Franciscato C. 2016. Alterações hematológicas e bioquímicas causadas por *Anaplasma marginale* em bovinos com aptidão leiteira da região Sudoeste do Paraná. *R. bras. Ci. Vet.* 23(3/4): 152-156.
- Birgel Junior E.B., Neves F.S., Salvatore L.C.A., Mirandola R.M.S., Távora J.P.F., Birgel E.H. 2003. Gestation and puerperium influence over the hepatic function of holstein cows. *Ars. Vet.* 19: 172-178.
- Brink P., Wright J.C., Schumacher J. 2005. An investigation of the ability of the glutaraldehyde test to distinguish between acute and chronic inflammatory diseases in horses. *Acta. Vet. Scand.* 46(1/2): 69-78.
- Canavessi A.M.O., Chiacchio S.B., Sartori R., Cury P.R. 2000. Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça nelore (*Bos indicus*) criados na região de Botucatu, São Paulo: influência dos fatores etários e sexuais. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 67(1): 9-17.
- Charles T.P., Campos O.F., Lizieire R.S. 1994. Uso do teste de coagulação pelo glutaraldeído como indicador do nível de imunoglobulinas no soro e sangue de bezerros recém-nascidos. *R. Soc. Bras. Zootec.* 23(1): 65-72.
- Devery-Pocius J.E., Larson B.L. 1983. Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostral immunoglobulins. *J. Dairy Sci.* 66(2): 221-226.
- de Vries M., Bokkers E.A.M., Dijkstra T., van Schaik G., de Boer I.J.M. 2011. Invited review: associations between variables of routine herd data and dairy cattle welfare indicators. *J. Dairy Sci.* 94(7): 3213-3228.
- Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. 1993. *Rosenberger - Exame Clínico dos Bovinos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 413p.
- Doll K., Schillinger D., Klee W. 1985. Der Glutaraldehyd-Test beim Rind – Seine Brauchbarkeit für Diagnose und Prognose innerer Entzündungen. *Zlb. Vet. Med. A.* 32: 581-593.
- Ferreira M.M., Melo M.M., Marques Junior A.P. 2001. Concentração de proteína séria total, albumina e globulinas em novilhas holandesas soro reagentes para leucose bovina a vírus durante a gestação e pós-parto. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, publicação online da EMV-UFBA. 1(3): 68-73.
- Fürll M. Stoffwechsel- und Mangelkrankheiten. 2005. In: Hofmann W. *Rinderkrankheiten – Innere und Chirurgische Erkrankungen*. p.363-475 2ªed. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- González F.H.D., Silva S.C. 2017. *Introdução a Bioquímica Clínica Veterinária*. Editora UFRGS, Porto Alegre. 519p.
- Greenough P.R. 1997. *Lameness in Cattle*. Saunders, Philadelphia. 277p.
- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Elsevier Academic Pres, Burlington. 916p.
- Kawamura T. 2002. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq. Bras. Cardiol.* 79(4): 437-441.
- Kováč G., Mudron P., Martincek M. 1987. Utilization of the glutaraldehyde coagulation test in cattle. *Acta Vet. Brno.* 56: 275-280.
- Liberg, P. 1978. The fibrinogen concentration in blood of dairy cows and its influence on the interpretation of the glutaraldehyde and formol-gel test reactions. *Acta Vet. Scand.* 19: 413-421.
- McSherry B.J., Horney F.D., Degroot J.J. 1970. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can. J. Comp. Med.* 34(3): 191-197.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454(7203): 428-435.
- Meirelles C., Dittrich T., Cipriano F., Ollhoff R.D. 2009. Evolução da soroprevalência da leucose enzoótica bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. *Semina: Ciênc. Agrár. – Londrina.* 30(3): 671-678.

- Metzner M., Horber J., Rademacher G., Klee W. 2007. Application of the glutaraldehyde test in cattle. *J. Vet. Med. A.* 54: 449-454.
- Nechanitzky K., Starke A., Vidondo B., Mülle H., Reckardt M., Friedli K., Steiner A. 2016. Analysis of behavioral changes in dairy cows associated with claw horn lesions. *J. Dairy Sci.* 99(4): 2904-2914.
- Paula M.C., Martins E.N., Silva L.O.C., Oliveira C.A.L., Valotto A.A., Ribas N.P. 2009. Interação genótipo x ambiente para produção de leite de bovinos da raça Holandesa entre bacias leiteiras no estado do Paraná. *R. Bras. Zootec.* 38(3): 467-473.
- Perissinotto M., Mourall D.J., Cruz, V.F., Souza S.R.L., Lima K.A.O., Mendes A.S. 2009. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos *fuzzy*. *Cienc. Rural.* 39(5): 1492-1498.
- Sandholm M. 1974. Die Feststellung der Hyper- $\gamma$ -globulinämie unter Praxisbedingungen. *Tierärztl. Prax.* 2: 237-240.
- Sprecher D.J., Hostetler D.E., Kaneene J.B. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology.* 47(6): 1179-1187.
- Smith B.P. 2009. *Large Animal Internal Medicine.* 4ed. Missouri: Mosby Elsevier. 1825p.
- Starke A. 2017. Comunicação pessoal durante o XII Congresso Brasileiro de Buiatria em Foz do Iguaçu. Médico-veterinário, professor da clínica de bovinos da Universidade de Leipzig - Alemanha.
- Thrall M.A. 2007. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.* 1º ed. Roca, São Paulo. 592p.
- Tyler J.W., Besser T.E., Wilson L., Hancock D.D., Sanders S., Rea D.E. 1996. Evaluation of a whole blood glutaraldehyde coagulation test for the detection of failure of passive transfer in calves. *J. of Vet. Intern. Med.* 10(2): 82-84.
- Valarcher J.F., Hägglund S. 2006. Viral Respiratory Infections in Cattle. *Anais do XXIV World Buiatrics Congress - Nice, France.*
- Zimmer C.R., Araújo D.F., Ribeiro P.B. 2010. Flutuação populacional de muscídeos (Diptera, Muscidae) simbovinos e sua distribuição sobre o corpo do gado de leite, em Capão do Leão, RS, Brasil. *Ciênc. Rural.* 40(3): 604-610.

**QUADRO 1. CATEGORIAS DE INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE COAGULAÇÃO DO GLUTARALDEÍDO E CLASSIFICAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO EM BOVINOS, ADAPTADO DE DOLL ET AL. (1985)**

| Categoria | Tempo de Coagulação do TG | Interpretação  | Grau do processo inflamatório |
|-----------|---------------------------|--|-------------------------------|
| 1         | 0 - ≤ 3 Minutos           | Elevado aumento na concentração de fibrinogênio e imunoglobulinas  | Grave                         |
| 2         | >3 - ≤ 6 Minutos          | Aumento moderado da concentração de fibrinogênio e imunoglobulinas | Médio                         |
| 3         | >6 - ≤15 Minutos          | Baixo aumento de concentração de fibrinogênio e imunoglobulinas    | Leve                          |
| 4         | > 15 Minutos              | Nenhum aumento na concentração de fibrinogênio e imunoglobulinas   | Não detectado                 |

**QUADRO 2. CLASSIFICAÇÃO DOS BOVINOS SEGUNDO SUA AVALIAÇÃO FÍSICA EM PROCESSO INFLAMATÓRIO (PI) LEVE/SAUDÁVEIS (PIL) E GRAVE (PIG) COM O RESPECTIVO NÚMERO DE ANIMAIS, FREQUÊNCIA RELATIVA, TEMPO MÉDIO E DESVIO PADRÃO OBTIDOS NO TESTE DE GLUTARALDEÍDO GRADUADO EM CATEGORIAS DE 1 A 4**

| Categoria               | 1     | 2     | 3     | 4     | Total | Média e Desvio padrão do tempo do teste (min) |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| PIL                     | 7     | 23    | 69    | 20    | 119   | 9,42 ± 4,25 <sup>a</sup>                      |
| Frequência Relativa (%) | 5,88  | 19,33 | 57,98 | 16,81 | 67,61 |   |
| PIG                     | 20    | 18    | 14    | 5     | 57    | 6,20 ± 4,19 <sup>b</sup>                      |
| Frequência Relativa (%) | 35,09 | 31,58 | 24,56 | 8,77  | 32,39 |   |

-Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa entre os processos ( $p < 0,0001$ ).

**QUADRO 3. COMPARAÇÃO ENTRE AS CATEGORIAS DO TESTE DE GLUTARALDEÍDO GRADUADO DE 1 A 4 EM RELAÇÃO AOS VALORES DA IDADE (ANOS), FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA (FR/MIN), TEMPERATURA RETAL (TR/°C) E MEDIANA DO ESCORE DE LOCOMOÇÃO (EL) NOS BOVINOS**

| Categoria        | Idade (anos)              | FR (m/min)                 | TR (°C)                    | EL             |
|------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|
| 1<br>(n=27)      | 5,07 ± 1,65 <sup>a</sup>  | 50,81 ± 11,04 <sup>a</sup> | 38,47 ± 0,29 <sup>ab</sup> | 3 <sup>a</sup> |
| 2<br>(n=41)      | 4,06 ± 1,99 <sup>ab</sup> | 47,07 ± 13,24 <sup>a</sup> | 38,65 ± 0,49 <sup>a</sup>  | 2 <sup>b</sup> |
| 3<br>(n=83)      | 3,69 ± 2,22 <sup>b</sup>  | 35,85 ± 6,24 <sup>b</sup>  | 38,43 ± 0,31 <sup>b</sup>  | 2 <sup>b</sup> |
| 4<br>(n=25)      | 3,32 ± 1,18 <sup>b</sup>  | 36,48 ± 7,86 <sup>b</sup>  | 38,43 ± 0,35 <sup>ab</sup> | 2 <sup>b</sup> |
| PIL<br>(n=119)   | 3,76 ± 2,15 <sup>A</sup>  | 38,25 ± 9,66 <sup>A</sup>  | 38,45 ± 0,34 <sup>A</sup>  | 1 <sup>A</sup> |
| PIG<br>(n=57)    | 4,29 ± 1,70 <sup>B</sup>  | 46,28 ± 12,08 <sup>B</sup> | 38,56 ± 0,42 <sup>A</sup>  | 2 <sup>B</sup> |
| Geral<br>(n=176) | 3,93 ± 2,02               | 40,85 ± 11,13              | 38,37 ± 0,22               | 2              |

-Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa entre as categorias; e letras maiúsculas diferem nas classificações PIL e PIG (p<0,05).  
Média ± desvio padrão.

**QUADRO 4. COMPARAÇÃO ENTRE AS CATEGORIAS DO TESTE DE GLUTARALDEÍDO DOS BOVINOS COM OS VALORES DO HEMATÓCRITO (HT), PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (PPT), ALBUMINA (ALB), GLOBULINA (GLO) E RELAÇÃO ALBUMINA E GLOBULINA (ALB/GLO) E FIBRINO GÊNIO (FIB)**

| Categoria        | HT (%)                    | PPT (g/dL)                | ALB (g/dL)               | GLO (g/dL)                | ALB/GLO                   | FIB (mg/dL)                   |
|------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1<br>(n=27)      | 26,00 ± 2,89 <sup>a</sup> | 7,78 ± 0,46 <sup>a</sup>  | 3,21 ± 0,61 <sup>a</sup> | 4,22 ± 0,93 <sup>ab</sup> | 0,83 ± 0,32 <sup>ab</sup> | 540,74 ± 164,69 <sup>a</sup>  |
| 2<br>(n=41)      | 28,76 ± 3,45 <sup>b</sup> | 7,57 ± 0,70 <sup>ab</sup> | 3,43 ± 0,74 <sup>a</sup> | 3,70 ± 1,09 <sup>a</sup>  | 1,03 ± 0,41 <sup>b</sup>  | 436,58 ± 154,52 <sup>ab</sup> |
| 3<br>(n=83)      | 30,10 ± 2,90 <sup>c</sup> | 7,48 ± 0,79 <sup>b</sup>  | 2,67 ± 0,60 <sup>b</sup> | 4,44 ± 0,96 <sup>b</sup>  | 0,65 ± 0,28 <sup>a</sup>  | 375,90 ± 146,16 <sup>b</sup>  |
| 4<br>(n=25)      | 30,4 ± 3,29 <sup>bc</sup> | 7,25 ± 0,73 <sup>b</sup>  | 2,75 ± 0,67 <sup>b</sup> | 4,15 ± 0,91 <sup>ab</sup> | 0,71 ± 0,29 <sup>a</sup>  | 352,00 ± 115,90 <sup>b</sup>  |
| PIL<br>(n=119)   | 29,98 ± 3,03 <sup>A</sup> | 7,46 ± 0,73 <sup>A</sup>  | 2,90 ± 0,68 <sup>A</sup> | 4,17 ± 0,94 <sup>A</sup>  | 0,76 ± 0,34 <sup>A</sup>  | 385,71 ± 142,19 <sup>A</sup>  |
| PIG<br>(n=57)    | 27,56 ± 3,59 <sup>B</sup> | 7,72 ± 0,75 <sup>B</sup>  | 3,01 ± 0,81 <sup>A</sup> | 4,24 ± 1,15 <sup>A</sup>  | 0,80 ± 0,39 <sup>A</sup>  | 466,67 ± 177,62 <sup>A</sup>  |
| Geral<br>(n=176) | 29,20 ± 3,41              | 7,54 ± 0,74               | 2,94 ± 0,72              | 4,19 ± 1,01               | 0,78 ± 0,36               | 411,93 ± 158,65               |

-Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa entre as categorias; e letras maiúsculas diferem nas classificações PIL e PIG (p<0,05).  
Média ± desvio padrão.

**QUADRO 5. CLASSIFICAÇÃO DAS VACAS NO TG DIVIDIDAS EM DOENTES E SAUDÁVEIS PARA AS FÓRMULAS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDITIVO DO TESTE DE GLUTARALDEÍDO PARA BOVINOS DE LEITE ADULTOS (N=176)**

| TG            | Doentes (+) | Saudáveis (-) | Total |
|---------------|-------------|---------------|-------|
| TG1           | 20          | 7             | 27    |
| TG2, TG3, TG4 | 37          | 112           | 149   |
| Total         | 57          | 119           | 176   |

**QUADRO 6. SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDITIVO DO TESTE DE GLUTARALDEÍDO PARA BOVINOS DE LEITE ADULTOS (N=176)**

|                           | Sensibilidade | Especificidade | Valor<br>preditivo<br>positivo | Valor<br>preditivo<br>negativo |
|---------------------------|---------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                           | %             |                |                                |                                |
| Teste de<br>Glutaraldeído | 35,1          | 94,1           | 74,1                           | 75,2                           |

## **CAPITULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Verificou-se neste estudo que a saúde dos bovinos criados nas presentes condições está aquém do desejável, visto o pequeno número de animais sem alterações ao exame físico ou considerando-se os valores bioquímicos. O teste de glutaraldeído (TG) revelou-se neste estudo em uso a campo com bovinos adultos útil na detecção de processos inflamatórios graves, porém com baixa sensibilidade. Pela sua alta especificidade e facilidade de uso a campo, aliando rapidez e baixo custo, ele poderá ser usado também como método de triagem para detectar com precisão os animais que não estão passando por processo inflamatório. Para o médico veterinário a campo, o ideal é sempre que ele associe o TG a um exame físico completo. Neste primeiro estudo brasileiro com bovinos adultos, o TG, por sua facilidade de execução e rapidez na leitura poderá se tornar uma ferramenta útil para o clínico de bovinos. A divulgação deste estudo e outros por vir podem contribuir para uma maior popularização na aplicação deste método simples e barato em uma área, saúde bovina, com grandes oportunidades para o crescimento da medicina veterinária.

## REFERÊNCIAS

- Alvarenga P.B., Rezende A.L., Justo, F.B., Rezende S.R., Cesar J.C.G., Santos M. R.; Mundim A. V.; Saut J. P. E. 2017. Perfil metabólico de vacas Jersey clinicamente saudáveis. *Pesq. Vet. Bras.* 37(2): 195-203.
- Álvarez J.A.C., Vergara J.C.M., Villadiego F.A.C., Martínez R.D.B., León V.E.G. 2013. Frecuencia de dermatobiosis cutánea bovina en vacas Holstein de un hato lechero en Viçosa (MG, Brasil). *Ver. CES. Med. Zootec.* 8(1): 82-94.
- Bagga A., Randhawa S.S., Sharma S., Bansal B.K. 2016. Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Vet. World.* 9(11): 1204-1208.
- Bernardo F.D., Conhizak C., Ambrosini F., Neto Silva A.F., Freitas F.L.C, Franciscato C. 2016. Alterações hematológicas e bioquímicas causadas por *Anaplasma marginale* em bovinos com aptidão leiteira da região Sudoeste do Paraná. *R. bras. Ci. Vet.* 23(3/4): 152-156.
- Birgel Junior E.B., Neves F.S., Salvatore L.C.A., Mirandola R.M.S., Távora J.P.F., Birgel E.H. 2003. Gestation and puerperium influence over the hepatic function of holstein cows. *Ars. Vet.* 19: 172-178.
- Brink P., Wright J.C., Schumacher J. 2005. An investigation of the ability of the glutaraldehyde test to distinguish between acute and chronic inflammatory diseases in horses. *Acta. Vet. Scand.* 46(1/2): 69-78.
- Canavessi A.M.O., Chiacchio S.B., Sartori R., Cury P.R. 2000. Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça nelore (*Bos indicus*) criados na região de Botucatu, São Paulo: influência dos fatores etários e sexuais. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 67(1): 9-17.
- Charles T.P., Campos O.F., Lizieire R.S. 1994. Uso do teste de coagulação pelo glutaraldeído como indicador do nível de imunoglobulinas no soro e sangue de bezerros recém-nascidos. *R. Soc. Bras. Zootec.* 23(1): 65-72.
- Devery-Pocius J.E., Larson B.L. 1983. Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostral immunoglobulins. *J. Dairy Sci.* 66(2): 221-226.
- de Vries M., Bokkers E.A.M., Dijkstra T., van Schaik G., de Boer I.J.M. 2011. Invited review: associations between variables of routine herd data and dairy cattle welfare indicators. *J. Dairy Sci.* 94(7): 3213-3228.
- Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. 1993. Rosenberger - Exame clínico dos bovinos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 413p.
- Doll K., Schillinger D., Klee W. 1985. Der Glutaraldehyd-Test beim Rind – Seine Brauchbarkeit für Diagnose und Prognose innerer Entzündungen. *Zlb. Vet. Med. A.* 32: 581-593.
- Ferreira M.M., Melo M.M., Marques Junior A.P. 2001. Concentração de proteína séria total, albumina e globulinas em novilhas holandesas soro reagentes para leucose bovina a vírus durante a gestação e pós-parto. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, publicação online da EMV-UFBA. 1(3): 68-73.
- Fürll M. Stoffwechsel- und Mangelkrankheiten. 2005. In: Hofmann W. Rinderkrankheiten – Innere und chirurgische Erkrankungen. p.363-475 2ªed. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- González F.H.D. 2009. Ferramentas de diagnóstico e monitoramento das doenças metabólicas. *Ciên. anim. bras.* 0(0).
- González F.H.D., Silva S.C. 2017. Introdução a bioquímica clínica veterinária. Editora UFRGS, Porto Alegre. 519p.
- Greenough P.R. 1997. Lameness in cattle. Saunders, Philadelphia. 277p.
- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. Elsevier Academic Pres, Burlington. 916p.
- Kawamura T. 2002. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq. Bras. Cardiol.* 79(4): 437-441.
- Kováč G., Mudron P., Martincek M. 1987. Utilization of the glutaraldehyde coagulation test in cattle. *Acta Vet. Brno.* 56: 275-280.
- Liberg P. 1978. The fibrinogen concentration in blood of dairy cows and its influence on the interpretation of the glutaraldehyde and formol-gel test reactions. *Acta Vet. Scand.* 19: 413-421.
- Liberg P. 1981. Glutaraldehyde and formol-gel tests in bovine traumatic peritonitis. *Acta. Vet. Scand.* 22(1): 78-84.
- Mcsherry B.J., Horney F.D., Degroot J.J. 1970. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can. J. Comp. Med.* 34(3): 191-197.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454(7203): 428-435.

- Meirelles C., Dittrich T., Cipriano F., Ollhoff R.D. 2009. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. *Semina: Ciênc. Agrár.* – Londrina. 30(3): 671-678.
- Metzner M., Horber J., Rademacher G., Klee W. 2007. Application of the glutaraldehyde test in cattle. *J. Vet. Med. A.* 54: 449-454.
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168(1): 28-40.
- Nechanitzky K., Starke A., Vidondo B., Mülle H., Reckardt M., Friedli K., Steiner A. 2016. Analysis of behavioral changes in dairy cows associated with claw horn lesions. *J. Dairy Sci.* 99(4): 2904-2914.
- Paula M.C., Martins E.N., Silva L.O.C., Oliveira C.A.L., Valotto A.A., Ribas N.P. 2009. Interação genótipo x ambiente para produção de leite de bovinos da raça Holandesa entre bacias leiteiras no estado do Paraná. *R. Bras. Zootec.* 38(3): 467-473.
- Perissinotto M., Mourall D.J., Cruz, V.F., Souza S.R.L., Lima K.A.O., Mendes A.S. 2009. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos *fuzzy*. *Cienc. Rural.* 39(5): 1492-1498.
- Rodriguez-Ledesma A., Cobo M.J., Lopez-Pujalte C., Herrera-Viedma E. 2015. An overview of animal science research 1945-2011 through science mapping analysis. *J. Anim. Breed Genet.* 132(6): 475-497.
- Sandholm M. 1974. Die Feststellung der Hyper-globulinämie unter Praxisbedingungen. *Tierärztl. Prax.* 2: 237-240.
- Simplício K.M.M.G., Sousa F.C., Faflari P.C., Silva P.C. 2013. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(5): 1339-1347.
- Sprecher D.J., Hostetler D.E., Kaneene J.B. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology.* 47(6): 1179-1187.
- Smith B.P. 2009. *Large animal internal medicine.* 4ed. Missouri: Mosby Elsevier. 1825p.
- Starke A. 2017. Comunicação pessoal durante o XII Congresso Brasileiro de Buiatria em Foz do Iguaçu. Médico-veterinário, professor da clínica de bovinos da Universidade de Leipzig - Alemanha.
- Thrall M.A. 2007. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.* 1º ed. Roca, São Paulo. 592p.
- Tyler J.W., Besser T.E., Wilson L., Hancock D.D., Sanders S., Rea D.E. 1996. Evaluation of a whole blood glutaraldehyde coagulation test for the detection of failure of passive transfer in calves. *J. of Vet. Intern. Med.* 10(2): 82-84.
- Valarcher J.F., Häggglund S. 2006. *Viral Respiratory Infections in Cattle.* XXIV World Buiatrics Congress - Nice, France.
- Zimmer C.R., Araújo D.F., Ribeiro P.B. 2010. Flutuação populacional de muscídeos (Diptera, Muscidae) simbovinos e sua distribuição sobre o corpo do gado de leite, em Capão do Leão, RS, Brasil. *Ciênc. Rural.* 40(3): 604-610.

# ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 24 de Setembro de 2015.

## PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 0984/2015

**TÍTULO DO PROJETO:** Avaliação do teste de Glutaraldeído em bovinos

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Rudiger Daniel Olhoff

**EQUIPE DE PESQUISA:** Rudiger Daniel Olhoff, José Leonardo Sviech Ratim, Elizabeth Ertal Bernaski

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – Medicina Veterinária

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária – PIBIC

|                         |           |  |   |               |
|-------------------------|-----------|--|---|---------------|
| <b>VIGÊNCIA PROJETO</b> | <b>DO</b> | 10/2015 a 07/2016                                    | <b>QUANTIDADE DE ANIMAIS</b>  | 200           |
| <b>ESPECIE/LINHAGEM</b> |           | <i>Bos taurus</i> - Bovinos / <i>Bubalinos</i>       | <b>Nº SISBIO</b><br>(Somente animais de vida livre)                   | Não se aplica |
| <b>SEXO</b>             |           | M/F  | <b>ATIVIDADES</b><br>(Somente animais de vida livre)                  | Não se aplica |
| <b>IDADE / PESO</b>     |           | 150kg a 600kg  | <b>ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS</b><br>(Somente animais de vida livre) | Não se aplica |
| <b>ORIGEM DO ANIMAL</b> |           | FEGA e propriedades de bovinos leiteiros Paranaenses | <b>LOCAL (IS)</b><br>(Somente animais de vida livre)                  | Não se aplica |

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **24.09.2015**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,  
  
 Prof. Dra. Marta Luciane Fischer  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
 Telefone: (41) 3271-2202 www.pucpr.br