

**ESPECIFICIDADE DA PROVA DO ANEL DE LEITE (PAL) PARA O DIAGNÓSTICO DA
BRUCELOSE BOVINA NA BACIA LEITEIRA DO MUNICÍPIO DE
SANTA MARIA - RS, BRASIL***

**Ring Test Specificity on the Diagnosis of Bovine Brucellosis
in Dairy Herds of Santa Maria County, RS, Brasil**

Lauro Luiz Chielle**, Rudi Weiblen***, Wlademir Silveira
Moreira**** e Maristela Lovato Flôres*****

RESUMO

Com o objetivo de determinar a especificidade da prova do anel em leite (PAL) para o diagnóstico da brucelose bovina, foram coletadas amostras de leite na plataforma de recebimento de leite da Companhia Riograndense de Laticínios e Correlatos (CORLAC) de Santa Maria - RS. Foram coletadas 503 amostras de leite procedentes de 354 propriedades. Desse total de amostras, 122 (24,26%) foram positivas e 381 (75,74%) foram negativas a PAL. As amostras positivas eram provenientes de 94 (26,56%) das 354 propriedades estudadas. As propriedades positivas foram visitadas, sendo coletado sangue de 760 vacas para as provas sorológicas (rápida em placa, "card test" e redução pelo mercaptoetanol). A essas provas foram positivas apenas três vacas (0,4%). Também foram coletadas 420 (55,26%) amostras de leite de vacas positivas ao "California mastitis test" (CNT), para exame bacteriológico.

UNITERMOS: prova do anel em leite, brucelose bovina.

*Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Santa Maria.

**Médico Veterinário, Professor do Colégio Agrícola de Frederico Westphalen e aluno do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. 97119 - Santa Maria, RS. Bolsista da CAPES.

***Professor Adjunto. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria. Pesquisador do CNPq.

****Professor Adjunto. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, C.C. Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

*****Professora Assistente. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, C.C. Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

SUMMARY

With the objective to determine the Ring Test specificity in the diagnosis of bovine brucellosis, milk samples were collected directly from milk pails at the local industry. Five hundred and three milk samples were collected from 354 farms. One hundred and twenty two samples (24.26%) were positive and 381 (75.74%) were negative at the Ring Test. The positive samples were from 94 (26.56%) of the 354 farms studied. The positive farm were visited and blood was collected from 760 cows and tested with the plate test, card test and mercaptoetanol reduction test. Only three serum samples were positive for brucellosis. Also 420 (55.26%) milk samples from California Mastitis Test (CMT) positive cows were collected for bacteriological examination.

KEY WORDS: Ring Test, bovine brucellosis.

INTRODUÇÃO

A prova do anel em leite (PAL) foi usada pela primeira vez na Alemanha (PACHECO & TIAGO DE MELLO, 16), tendo inicialmente grande aceitação entre os países escandinavos, Alemanha e Suíça. Posteriormente, teve seu uso generalizado, principalmente após a divulgação de resultados satisfatórios por parte de outros pesquisadores (ARANALDE et alii, 2; MOTA et alii, 12; ROEPKE, 17; ROEPKE & STILES, 18).

SZYFRES & DURAN (21) realizaram a PAL em leite de abastecimento da cidade de Azul (Argentina), encontrando 41% de reagentes. MOTA et alii (12), realizando a PAL em vários tambos no município de Santa Maria (RS), encontraram 4,9% das amostras examinadas como sendo positivas. ARANALDE et alii (2) observaram, através de trabalho com a PAL na bacia leiteira de Pelotas (RS), um percentual de 10,1% de animais positivos. A prevalência de brucelose bovina na bacia leiteira de Goiânia (GO) foi levantada pela PAL no leite fornecido à Cooperativa Central Rural de Goiânia e Companhia de Laticínio Goiano, situando-se em 17,38% (TÔRRES et alii, 22).

As vantagens da prova do anel em leite (PAL) têm sido citadas por ALTON et alii (1), BAILEY (3), COSTA (8), GARCIA-CARRILLO (9), GARCIA-CARRILLO (10), HAFEZ (11), NOVAS & FURLONG (13), ROEPKE & STILES (18) e SUTHERLAND (20). Entre as principais, citam: praticidade, segurança, simplicidade e utilidade na profilaxia da brucelose bovina, além de boa sensibilidade, e é uma prova coletiva de estáculo que permite diagnosticar brucelose em rebanhos, para depois realizar uma investigação

individual, sendo também de fácil execução e interpretação. Segundo os mesmos autores, as principais desvantagens da PAL são: é restrita ao gado leiteiro; só pode ser aplicada em animais em lactação; é sujeita a resultados falsos positivos em leite procedente de animais vacinados após a idade indicada com a vacina B19, assim como em animais que estão no início (pela presença do colostro) ou final de lactação (pela presença de células de descamação da gândula mamária e aumento fisiológico no número de leucócitos), em infecções inespecíficas (mastites) e devido a fatores ecológicos (condicionam maior ou menor sobrevivência do agente). A PAL, por si só, não pode ser considerada uma prova confiável para o diagnóstico de rebanhos brucélicos (ROEPKE, 17).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em diferentes etapas. A primeira parte constituiu-se da coleta de amostras de leite em tarros na indústria e testes pela prova do anel em leite (PAL). As etapas seguintes foram realizadas nas propriedades identificadas como positivas a essa prova, que constituiram-se na realização do "California mastitis test" (CMT) e coleta de sangue para provas sorológicas. Das vacas que reagiram positivamente no CMT, foi coletado leite para exame bacteriológico.

Foram coletadas 503 amostras de leite de recipientes com capacidade de 15 a 50 litros, procedentes de 354 propriedades que enviaram o produto para resfriamento e beneficiamento na Companhia Riograndense de Lacticínios e Correlatos (CORLAC - Santa Maria, RS). As amostras foram coletadas dos vasilhames entregues na plataforma de recebimento da CORLAC. Após prévia homogeneização do conteúdo, com uso de conchas de aço inoxidável, eram retiradas amostras de 30ml e colocadas em vidros esterilizados contendo 1,5ml de formalina a 1% (ALTON et alii, 1). Os vidros foram identificados com o número de matrícula dos cooperados, acondicionados em caixa de isopor contendo gelo e enviados para laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, onde as amostras permaneciam 48 horas na temperatura de 4 a 6°C, até o momento do processamento.

As 503 amostras de leite foram submetidas à prova do anel em leite, conforme recomendações de ALTON et alii (1), BRASIL (5), CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (7) e OLASCOAGA (15).

Após conhecer-se os resultados da prova do anel em leite, foram visitadas as 94 propriedades positivas, realizando-se o "California

"mastitis test" (CMT) em todas as vacas, independente do estágio da lactação. Independente do grau de reação ao CMT, coletou-se amostras de leite de 760 vacas em vidros esterilizados. O leite era coletado, desprezando-se os três primeiros jatos de leite, em um balde plástico. A glândula mamária era lavada, a assepsia dos tetos era feita utilizando-se algodão embebido em álcool iodado a 10%. As amostras de leite foram coletadas dos quartos reagentes ao CMT na forma de "pool". As amostras foram, em seguida, acondicionadas em caixa de isopor em gelo e enviadas ao laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), para exame bacteriológico. Coletou-se, também, sangue de todas as 760 vacas para realização de provas sorológicas para diagnóstico de brucelose bovina (rápida em placa, "card test" e redução pelo mercaptoetanol). O sangue foi coletado por punção da jugular e, após a retração do coágulo, o soro era separado e refrigerado até ser testado dentro de 24 horas.

O conjunto de raquete e solução reagente para a realização da prova do CMT foi adquirido da FATEC e manuseado segundo orientações do fabricante. A interpretação do resultado foi executada conforme as recomendações de SCHALM & NOORLANDER (19).

Uma hora antes da realização da PAL, tanto as amostras de leite como o antígeno foram colocados à temperatura ambiente para só então serem utilizados. As amostras eram homogeneizadas invertendo-se várias vezes os recipientes para uma perfeita mistura da gordura. Com uma pipeta retirava-se um mililitro de leite, que era colocado em tubos de 12 x 75mm e sobre o leite acrescentava-se uma gota de antígeno com auxílio de um conta-gotas calibrado para 0,03ml; fazia-se homogeneização do material pela inversão do tubo, sem permitir a formação de espuma. Os tubos eram, então, colocados na estufa, à temperatura de 37°C, durante 60 minutos. Após a incubação, realizou-se a leitura conforme recomendações de ALTON et alii (1), BRASIL (5), CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (7) e GARCIA-CARRILLO (9).

Foram realizados 420 exames bacteriológicos no laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Os exames microbiológicos de isolamento e identificação de microrganismos foram realizados segundo BIER (4) e CARTER (6).

As provas das amostras de soro sanguíneo foram realizadas no laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria. Foram examinadas 760 amostras. As provas sorológicas realizadas foram: rápida em placa, "card test" e

redução pelo mercaptoetanol e interpretadas em conjunto e de acordo com ALTON et alii (1), BRASIL (5), CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Resultados da prova do anel em leite (PAL) em amostras de leite coletadas na plataforma de recebimento de leite da Companhia Riograndense de Lacticínios e Correlatos - CORLAC - Santa Maria, RS.

Número de amostras	Positivas		Negativas	
	Nº	%	Nº	%
503	122	24,26	381	75,74

TABELA 2. Resultados das provas sorológicas realizadas em vacas das 94 propriedades do município de Santa Maria (RS) com prova do anel em leite positivas.

Provas	Positivas	Negativas	Total	Positivas (%)
Rápida em placa*	175	585	760	23,0
"Card test"	21	739	760	2,8
Mercaptoetanol	3	757	760	0,4

*Positivas: amostras com aglutinação maior ou igual a 25 UI.

Os resultados das provas sorológicas realizadas em vacas das 94 propriedades positivas à PAL no município de Santa Maria, RS, estão resumidos na Tabela 2.

Realizou-se a prova do anel em leite nas 503 amostras coletadas, obtendo-se 122 (24,26%) positivas, correspondendo a 94 (26,56%) propriedades, observações já descritas por SZYRES & SURAN (21), em leite de abastecimento da cidade de Azul (Argentina), os quais encontraram um percentual de 41% de amostras positivas. COSTA (8), no município de

Barra Mansa (RJ), examinando 360 animais, verificou 175 (48,6%) de positivos. MOTA et alii (12), usando a prova do anel em leite em 102 tambos no município de Santa Maria (RS), determinaram que 4,9% das amostras coletadas foram positivas. No entanto, quando foi coletado soro de 52 animais, 14% foram positivos para brucelose bovina. Esses resultados são completamente diferentes dos encontrados no presente trabalho. TÔRRES et alii (22), na bacia leiteira de Goiânia (GO), determinaram a prevalência através da prova do anel em leite, chegando a um percentual de 17,38%. ARANALDE et alii (2), em trabalho realizado pela PAL na bacia leiteira de Pelotas (RS), encontraram 10,1% de animais positivos. No entanto, os autores mencionadas nunca verificaram a especificidade da PAL, pois os mesmos não realizaram provas sorológicas individuais nos animais das propriedades estudadas.

Os autores ALTON et alii (1), BAILEY (3), GARCIA-CARRILLO (9), NOVAS & FURLONG (13), OGONOWSKI & McDIARMID (14), ROEPKE & STILES (18) e SUTHERLAND (20) descreveram a boa especificidade da prova do anel em leite. Entretanto, no presente trabalho foi verificada uma baixa especificidade da PAL, pois em uma grande percentagem de amostras compostas somente 0,4% foram positivas sorologicamente para brucelose bovina nos exames individuais. ROEPKE (17) cita que a PAL por si só não pode ser considerada uma prova confiável para o diagnóstico de rebanho brucélico. A afirmação do autor pode ser confirmada no presente trabalho, pois somente 0,4% das amostras de soro foram positivas para brucelose bovina, interpretadas pelo conjunto das provas, enquanto que 26,56% do leite examinado foi positivo na PAL. Esses dados indicam uma baixa especificidade da PAL.

CONCLUSÕES

A prova do anel em leite (PAL) por si só não pode ser considerada uma prova confiável para diagnóstico da brucelose bovina. Esta prova deve ser indicada para rebanhos com baixos índices de mastite bovina; portanto, não pode ser utilizada como diagnóstico da brucelose bovina na região estudada. Ficou também evidenciado que a mastite bovina interfere no diagnóstico pela prova do anel em leite. Os leucócitos, células de descamação da glândula mamária ou, talvez, componentes抗ígenicos comuns são as causas mais prováveis dos falsos positivos. O uso das provas sorológicas e interpretadas no seu conjunto é fundamental para a confirmação de diagnóstico para brucelose bovina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e FIPE, pelo parcial financiamento deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. ALTON, G.G.; JONES, M.L. & PIETZ, D.E. *Las Técnicas de Laboratorio en Brucelosis.* 2^a ed. Genebra, FAO/OMS, 1976. 175p.
2. ARANALDE, A.A.; MARTINS, L.F. & ZIEGLER, J.C. Ocorrência de estafilococcus coagulase positiva no leite cru da bacia leiteira de Pelotas - RS. *Revista do Centro de Ciências Rurais,* 4(2):155-8, 1974.
3. BAILEY, W. *Manual de Veterinária para Criadores de Gado.* São Paulo, Andrei, 1982. 429p.
4. BIER, O. *Bacteriología e Imunología.* 17^a ed. São Paulo, Melhoramentos, 1976. 1076p.
5. BRASIL. Normas para a profilaxia de brucelose animal. Portaria nº 23/76, de 20 de janeiro de 1976. *Diário Oficial, Brasil,* 16/02/76, seção 1, pt. 1, p.2266-9.
6. CARTER, G.R. *Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micrología Veterinarias.* Zaragoza, Arribia, 1969. 331p.
7. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Pruebas Complementarias para el Diagnóstico Serológico de la Brucelosis.* Ramos Mejia, 1972. 16p. (Mimeografado)
8. COSTA, A.F. Inquérito sobre brucelose bovina, por meio de provas de anel em leite. Barra Mansa (RJ). *Revista Militar Remonte Veterinária,* 13(1-2):41-5, 1953.
9. GARCIA-CARRILLO, C. Métodos para el diagnóstico de la brucelosis. *Gaceta Veterinaria,* 32(246):665, 1970.
10. GARCIA-CARRILLO, C. Conceptos sobre control de la brucelosis. *Gaceta Veterinaria,* 34(266):411-26, 1972.
11. HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal.* 4^a ed. São Paulo, Manole, 1982. 20p.
12. MOTA, T.M.B.; VALLANDRO, A.; PASIN, I.P. & GAIDA, F.P. Brucelose no gado leiteiro em Santa Maria (RS). *Revista da Faculdade de Farmácia,* 9(2):67-72, 1963.
13. NOVAS, J.C.V. & FURLONG, J. *Práticas sanitárias para o rebanho leiteiro: bezerros/vacas.* 3: *Curso de Pecuária Leiteira.* 2^a ed. São Paulo, Companhia Nestlé, 1986. 163p.
14. OGONOWSKI, K. & McDIARMID, A. Comparison of the Ring, Plate and Whay Tests for Brucellosis, using milk from cattle of proven Brucella Status. *Veterinary Record,* 66(48):751-4, 1954.
15. OLASCOAGA, C.R. Diagnóstico de la brucelosis. *Boletín Zoonosis,* 18:107-1, 1976.
16. PACHECO, G. & TIAGO DE MELLO, M. Brucelose. Rio de Janeiro, Ateno, 1956. 585p.
17. ROEPKE, M.H. The *Brucella abortus* ring test. Chapter in "brucellosis": A Symposium. American Associated of Advanced Science, 1950, p.126-35.

18. ROEPKE, M.H. & STILES, F.C. Potential efficiency of milkring test for detection of brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*, 31(12):2145-9, 1970.
19. SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130(5):99-204, 1957.
20. SUTHERLAND, S.S. Imunología de la brucellosis bovina. *Gaceta Veterinaria*, 43(359):278, 1981.
21. SZYFRES, B. & DURAN, A. Investigación sobre la presencia de Brucella en la leche de abastecimiento de la ciudad de Azul. *Boletín Oficina Sanitaria Panamericana*, 60(5):391-5, 1966.
22. TÔRRES, A.J.A.; CARVALHO, A.S. & TÔRRES, R.A. Levantamento da bacia leiteira de Goiânia através do "Ring Test". *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária*, 2(1):369-75, 1972.