

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**AÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) E AGENTES
BACTERIANOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE
REBANHOS CAPRINOS**

NITERÓI, RJ

2014

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**AÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) E AGENTES
BACTERIANOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE
REBANHOS CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Orientador: Elmiro Rosendo do Nascimento

Co-orientador: Juliana Ferreira de Almeida

Niterói, RJ

2014

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**AÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) E AGENTES
BACTERIANOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE
REBANHOS CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento - UFF
Orientador

Prof^a Dr^a Juliana Ferreira de Almeida – UFF
Co-orientador

Prof^a Dr^a Maria Helena Cosendey de Aquino - UFF

Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevedo – UFS

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro – UFRPE

Niterói, RJ
2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

A minha família, pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, por todos os ensinamentos e suporte despendidos durante todos os anos de pós graduação.

A minha co-orientadora, Juliana Ferreira de Almeida, pela orientação e pelas inúmeras contribuições para a elaboração desta tese.

À professora Virgínia Léo de Almeida Pereira, pela atenção, amizade e auxílio em diversos momentos. A todos os demais professores e funcionários do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública (MSV) da UFF, que tenham auxiliado de alguma forma com este trabalho.

À professora Maria Lúcia Barreto e demais colaboradores do Núcleo de Diagnóstico de Micoplasmose da UFF.

Aos professores, Eliane Teixeira Mársico e Marco Antonio Sloboda Cortes, por terem colaborado com a obtenção de dados deste estudo.

Ao professor Roberto Soares de Castro, por todas as contribuições e conhecimentos repassados.

À querida médica veterinária, Helena Magalhães, pelo imenso carinho e fundamental suporte na finalização desta tese.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial aos amigos Leandro Machado, Raquel Gouvêa, Camila Serva, Felipe Faccini; e a todos os demais que tenham contribuído para a realização desta pesquisa.

Aos queridos técnicos dos laboratórios de Epidemiologia Molecular e Bacteriologia da UFF, Fernanda Aguiar e Wilker Menezes, pela imprescindível ajuda na confecção das minhas análises. E a todos os estagiários e bolsistas destes laboratórios.

À equipe do Laboratório de Virologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela atenção e colaboração na obtenção de dados, em especial aos médicos veterinários Sérgio Alves e Ana Cláudia Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram com a realização deste trabalho.

RESUMO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE), infecções por micro-organismos do gênero *Mycoplasma* e as mastites bacterianas causam impacto econômico considerável sobre a caprinocultura leiteira. Por esta razão, o presente estudo teve por objetivo determinar a prevalência destas três infecções em rebanhos caprinos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro e avaliar a influência do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) sobre a qualidade microbiológica do leite, através da contagem de células somáticas (CCS), contagem total de bactérias (CTB) e isolamento bacteriano. Foram coletadas amostras de sangue e leite de cento e trinta e oito (138) cabras das raças Saanen e Parda Alpina de nove rebanhos distintos. Para o diagnóstico da CAE, diferentes métodos foram comparados: imunodifusão em gel de agarose (IDGA), "nested"-PCR do sangue e "nested"-PCR do leite. Já a presença de micoplasmose foi avaliada através de PCR e isolamento de amostras de leite e ELISA a partir do soro sanguíneo. Das cabras analisadas, 47,83% (66/138) apresentaram resultado positivo para CAE. A IDGA mostrou-se o teste mais sensível ($P < 0,05$), com 43,48% (60/138) de positividade, seguido da "nested"-PCR do sangue, 26,81% (37/138) e "nested"-PCR do leite, 10,87% (15/138). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a CCS média de animais negativos e positivos para CAE, de 2.311 mil e 2.242 mil células/mL de leite, respectivamente. Não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre a positividade para CAE e o isolamento bacteriano, positivo em 50% das amostras (69/138). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a CCS média de animais negativos e positivos no isolamento, de 1.942 mil e 2.389 mil células/mL de leite, respectivamente. Em uma amostragem de cinco rebanhos, a média da CTB foi 947.000 UFC/mL de leite, havendo forte correlação entre CTB e CCS, sendo *Staphylococcus* Coagulase Negativa a bactéria mais isolada (53,49%). Foram evidenciados animais positivos para *Mycoplasma agalactiae* em um dos rebanhos analisados, com 10% (2/20) de positividade no isolamento, 20% (5/20) na PCR e 85% (17/20) no ELISA indireto, sendo o primeiro relato da ocorrência de *M. agalactiae* no Estado do Rio de Janeiro e fora da região nordeste brasileira. A avaliação destes resultados permite que se afirme que a CAE está amplamente disseminada no Estado do Rio de Janeiro e que a CCS não serve de critério para avaliar mastite subclínica em cabras, devendo ser associada à CTB.

Palavras-chave: Leite de cabra. Mastite. Artrite Encefalite Caprina. Micoplasmas. IDGA. PCR. CCS. CTB.

ABSTRACT

Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), *Mycoplasma* spp. infections and bacterial mastitis cause considerable economy impact on dairy caprinoculture. The present experiment studied prevalence of these infections from dairy herds in Rio de Janeiro state, Brazil, evaluating how CAE can influence milk microbiologic quality through Somatic Cell Count (SCC), Total Bacterial Count (TBC) and bacterial isolation. Blood and milk was obtained from 138 Saanen and Alpine healthy goats in different stages of lactation, from nine dairy herds. Three different CAE diagnostic methods were compared: AGID, nested-PCR on blood and on milk. The presence of mycoplasma was evaluated through blood serum ELISA and milk PCR plus bacterial isolation. From all animals analyzed, 47.83% (66/138) tested positive for CAE. AGID was more sensitive ($P < 0.05$), with 43.48% (60/138) of positivity, followed by blood nested-PCR, 26.81% (37/138) and milk nested-PCR, 10.87% (15/138). CAE infection did not influence SCC ($P > 0.05$); negative and positive animals showed 2,311,000 and 2,224,200 cells/mL of milk, respectively. From all samples submitted to bacterial isolation, half were positive (50%; 69/138). No correlation ($P > 0.05$) was found between CAE infection and bacterial isolation. Animals testing positive and negative for bacterial isolation had similar mean SSC ($P > 0.05$), of 1,942,000 and 2,389,000 cells/mL of milk, respectively. Mean TBC was 947,000 CUF/mL of milk. TBC and CCS showed high association ($P < 0.05$). Coagulase Negative Staphylococci was more prevalent (53.49%). *Mycoplasma agalactiae* infection was detected in a single herd with twenty animals: 10% (2/20) were positive by isolation, followed by indirect immunoperoxidase, 20% (5/20) in PCR and 85% (17/20) by ELISA. To our knowledge, this is the first description of *M. agalactiae* infecting goats in Rio de Janeiro and outside the northeastern region of Brazil. Obtained results show that CAE is a highly spread infectious disease in Rio de Janeiro and that SCC should be associated with TBC for caprine mastitis diagnosis, for SCC alone does not serve as criteria to detect subclinical mastitis in goats.

Key-words: Goat milk. Mastitis. Caprine Arthritis Encephalitis. Mycoplasma. AGID. PCR. SCC. TBC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p.9

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.12

2.1 PRODUÇÃO DE CAPRINOS, p.12

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O LEITE DE CABRA, p.13

2.3 QUALIDADE DO LEITE DE CABRA *VERSUS* MASTITE CAPRINA, p.15

2.3.1 Etiologia da mastite caprina, p.16

2.3.2 Diagnóstico da mastite caprina, p.17

2.4 MICOPLASMAS, p.19

2.5 AGALAXIA CONTAGIOSA DOS OVINOS E CAPRINOS (ACOC), p.21

2.5.1 Etiopatogenia e sinais clínicos, p.21

2.5.2 Diagnóstico e prevenção, p.22

2.6 VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV), p.24

2.6.1 Etiologia e patogenia, p.24

2.6.2 Diagnóstico, p.25

3 DESENVOLVIMENTO, p.29

3.1 QUEDA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA POR SURTO DE MICOPLASMOSE, p.29

3.2 INFECÇÃO POR *Mycoplasma agalactiae* EM REBANHO CAPRINO LEITEIRO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, p.37

3.3 ISOLAMENTO BACTERIANO E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, p.45

3.4 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA SOBRE O ISOLAMENTO BACTERIANO, CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS CAPRINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, p.56

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p.69

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.70

1 INTRODUÇÃO

Os caprinos estão distribuídos mundialmente, face à grande capacidade de adaptação às diversas condições climáticas, geográficas e de manejo. Sendo assim, a caprinocultura é uma atividade explorada em todos os continentes, com expressão econômica em alguns países, sobretudo nos últimos anos, quando vem apresentando crescimento em relação à quantidade e à qualidade dos rebanhos (SAMPELAYO et al., 2007).

O leite de cabra apresenta uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, o que o qualifica como um alimento de elevada qualidade nutricional. Representa grande importância na alimentação infantil pelas suas características de hipoalergenicidade e digestibilidade devido aos glóbulos de gordura de tamanhos diminuídos (HAENLEIN, 2004). No Brasil, a Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000) regulamenta as condições de produção e identidade, além de requisitos relacionados à qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano.

A sanidade da glândula mamária pode interferir na qualidade do leite produzido tanto do ponto de vista da segurança alimentar quanto no beneficiamento. A infecção da glândula mamária, ou mastite, provoca transtornos na secreção láctea e em diversos parâmetros associados com a qualidade do leite. As principais bactérias envolvidas na mastite caprina são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), *Streptococcus* spp., bastonetes Gram negativos, *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma* spp. (BERGONIER et al., 2003).

Para o diagnóstico da mastite, emprega-se rotineiramente o "California Mastitis Test" (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS), sobretudo na infecção de caráter subclínico, sendo o cultivo de leite utilizado na identificação do agente etiológico (PEIXOTO et al., 2010). No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite caprino, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (PAES et al., 2003). No entanto, também podem ser utilizadas outras técnicas para a avaliação da contaminação do leite caprino, tal qual a Contagem Total de Bactérias (CTB), expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro de leite (UFC/mL), com valor máximo de 500.000 UFC/mL para o leite de cabra cru (BRASIL, 2000). Muito embora a cultura bacteriológica do leite seja

considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico das infecções mamárias, o CTB poderia avaliar de maneira mais fidedigna a presença ou ausência de mastite, uma vez que a mera existência de bactérias no leite não significa obrigatoriamente que o úbere está infectado.

Outra enfermidade de relevante importância para o setor é a Artrite Encefalite Caprina (CAE), virose debilitante e progressiva, sem tratamento específico, responsável por causar considerável perda econômica ao criador (MOREIRA et al., 2007). Caracteriza-se clinicamente por artrite, encefalite, mastite, emagrecimento e pneumonia, embora em grande parte das infecções, nenhum sinal clínico esteja presente. Ao ocasionar emaciação progressiva, artrite, pneumonia e mastite, esta infecção parece interferir negativamente sobre a produtividade do rebanho leiteiro. Por isto, nos casos específicos em que a glândula mamária está acometida, de forma clínica ou subclínica, é importante realizar o diagnóstico diferencial com infecções bacterianas. A Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) é o exame diagnóstico recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo o teste mais utilizado em vários países nos programas de controle da doença (MOOJEN, 2001). Por outro lado, métodos moleculares de diagnóstico, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizados para identificar a susceptibilidade de diferentes tipos celulares frente à infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), bem como o seu papel na persistência da enfermidade no organismo animal. A PCR é considerada uma técnica bastante sensível e específica, capaz de detectar animais com infecção recente ou que ainda não soroconverteram (ANDRIOLI et al., 2006).

Em pequenos ruminantes, os micoplasmas são associados a infecções respiratórias, mastites, artrites, doenças da esfera reprodutiva e lesões oculares. Destacam-se entre estas enfermidades a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) e a Agalaxia Contagiosa, designadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como doenças de notificação compulsória, devido ao impacto econômico que ocasionam nos rebanhos (ALMEIDA, 2009). Para o diagnóstico das micoplasmoses utiliza-se o isolamento e a identificação dos agentes infecciosos, realizado pelo cultivo em meios específicos contendo soro animal. Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apresentam vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, aumentando a possibilidade de detecção de

diferentes espécies de micoplasmas. Estudos recentes com pesquisas de anticorpos indicam que testes sorológicos, como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), têm sido amplamente utilizados pela consistência de seus resultados (CAMPOS, 2008).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo determinar a prevalência da CAE, micoplasmoses e mastite em rebanhos caprinos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro e avaliar a influência do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) sobre a qualidade microbiológica do leite através da contagem de células somáticas (CCS), contagem total de bactérias (CTB) e isolamento bacteriano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE CAPRINOS

A origem da cabra é, provavelmente, europeia, partindo da Ásia e Pérsia, e, sem relatos exatamente precisos, estima-se que surgiu há mais de 10.000 anos. A *Capra hircus*, que seria a primeira espécie domesticada, acompanhou os humanos, fornecendo leite, carne e couro, e, inclusive na Bíblia, aparece como animal domesticado que servia ao homem (MONTINGELLI, 2005).

Os caprinos estão distribuídos mundialmente, face à grande capacidade de adaptação às diversas condições climáticas, geográficas e de manejo. Sendo assim, a caprinocultura é uma atividade explorada em todos os continentes, com expressão econômica em alguns países, sobretudo nos últimos anos, quando vem apresentando crescimento em relação à quantidade e à qualidade dos rebanhos. A população de pequenos ruminantes é vista como uma fonte sustentável com excelente possibilidade de rentabilidade econômica e estabilidade demográfica, o que a torna de especial importância para as regiões áridas e semi-áridas, nas quais as raças nativas são exploradas em regimes extensivos ou semi-extensivos (SANZ SAMPELAYO et al., 2007).

Atualmente, a China é o país com o maior rebanho caprino mundial, seguido de Índia, Bangladesh e Paquistão. Em 2010, o continente asiático foi responsável por 58,7% da produção mundial de leite de cabra, o que representou mais de nove milhões de toneladas. Nas Américas, esse valor não passou de 362 mil toneladas, sendo o Brasil responsável por apenas 0,9% da produção mundial (FAO, 2012).

No Brasil, o rebanho caprino soma mais de nove milhões de cabeças, sendo o mais expressivo no continente americano. A região Nordeste é a detentora da maior parte do rebanho nacional, sendo Bahia, Pernambuco e Piauí os estados com os maiores plantéis (IBGE, 2011). Apesar de a região sudeste dispor de apenas 4% do efetivo caprino no Brasil, destaca-se pela representatividade de seus estados no agronegócio caprino leiteiro, sendo responsável por aproximadamente 55% do total de leite de cabra produzido no país com uma cadeia produtiva bastante organizada. Caracteriza-se pelo uso de sistemas de produção intensivos confinados, dispostos nas proximidades de centros urbanos. As raças leiteiras adotadas são especializadas, principalmente Saanen, Alpina e Toggenburg, ou mestiças destas

raças, mantidas em galpões e com alimentação fornecida no cocho (ALMEIDA et al., 2013; BORGES, 2006). Todavia, independente do sistema de exploração, ainda é incipiente a adoção de programas sanitários, o que tem favorecido a introdução e disseminação de agentes infecciosos, tais como o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), as clostridioses e as infecções por *Mycoplasma* spp, que podem ocasionar impacto econômico significativo nos rebanhos leiteiros (ALCÂNTARA, 2010).

É inquestionável que a produção de caprinos representa uma alternativa na oferta de carne, leite e derivados, exercendo influência na alimentação, especialmente da população rural. A produção de peles, de aceitação nacional e internacional, tem correspondido a cerca de 20% do valor atribuído ao animal abatido, constituindo receita para o criador, além de gerar recursos para os estados e para o país. Conseqüentemente, o negócio envolvendo esta espécie atua como mais um atrativo para ocupar um grande contingente de pessoas, contribuindo de forma significativa para a fixação do homem no campo (MARINHO, 2008).

A importância econômica da caprinocultura, como um dos pilares de subsistência de famílias que vivem da exploração dessa atividade, advém do melhoramento genético das raças naturalizadas para aptidões específicas (leite, carne ou pele), associado ao aumento expressivo de consumo de produtos do setor. Em contrapartida, problemas sanitários e de ordem zootécnica são comuns nas criações de pequenos ruminantes. Perdas por morte de animais, deficiências na higiene dos apriscos e no manejo nutricional, doenças infecciosas e parasitárias, constituem os principais entraves para o aumento dos índices de produtividade (CAMPOS, 2008).

Embora a caprinocultura no Brasil esteja em expansão, conte com o incentivo de ações conjuntas de governos estaduais, instituições de pesquisa e criadores, a produção ainda é baixa quando comparada a de outros países, o que está relacionado à precariedade da tecnologia aplicada, aliada a não utilização de padrões de qualidade para os produtos caprinos (AMARAL et al., 2011).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O LEITE DE CABRA

O leite de cabra constitui um líquido branco, puro, de odor e sabor especiais e agradáveis. A cor se deve ao fato de não apresentar caroteno e sim a pró-vitamina A. Possui um gosto típico que, dependendo de onde os animais estão instalados e

da alimentação que recebem, pode se apresentar mais forte, muitas vezes indesejável. Não possui nenhum cheiro típico ou desagradável, mas se o apresentar é devido às más condições de higiene. O mau cheiro, denominado hírcino, é transmitido pelo bode quando este se encontra perto das cabras em lactação, impregnando-as, além de poder transmiti-lo diretamente ao leite (QUADROS, 2008).

O fato de o leite caprino apresentar uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, o qualifica como um alimento de elevado teor nutricional. É naturalmente rico nos ácidos graxos voláteis capróico, caprílico e cáprico, comumente utilizados em tratamentos de pessoas com problemas de má absorção, pela habilidade de fornecer energia, além de inibir e limitar a deposição de colesterol nos tecidos. Representa grande importância na alimentação infantil pelas suas características de hipoalergenicidade e digestibilidade devido aos glóbulos de gordura de tamanhos diminuídos (HAENLEIN, 2004).

O leite de cabra é similar ao leite de vaca em sua composição básica, mas difere deste em determinadas concentrações de nutrientes. Algumas propriedades físico-químicas fazem do leite de cabra um alimento com menores glóbulos de gordura, maior porcentagem de ácidos gordurosos de pequena e média cadeia e com formação de coalho mais macio. Suas proteínas possuem maior digestibilidade quando comparadas ao leite de vaca, além de apresentar maior biodisponibilidade de ferro (AMARAL et al., 2011).

Diversos estudos a respeito da composição do leite caprino vêm sendo realizados com o intuito de se obter informações sobre a qualidade e a aceitação do produto pelos consumidores. Entretanto, existem lacunas de informações sobre a composição química desse alimento em regiões tropicais e em suas microrregiões, sobretudo em relação à influência de múltiplos fatores, como raça, mestiçagem, ambiente, alimentação e período de lactação. Nesse contexto, sabe-se que fatores genéticos, fisiológicos, climáticos e principalmente de origem alimentar, podem afetar as características químicas, físicas e as propriedades do leite caprino (COSTA et al., 2009).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000) regulamenta as condições de produção e identidade, além de requisitos relacionados à qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano. Tal legislação fixa alguns padrões

físico-químicos mínimos, a saber: 2,8% de proteína bruta, 4,3% de lactose, 8,2% de sólidos não gordurosos e 0,7% de cinzas.

A demanda por produtos de origem animal de qualidade torna-se cada vez mais visada pelo mercado consumidor gerando a busca pela produção e processamento de alimentos mais elaborados e com certificação de qualidade garantida. Tal fato não é diferente para o leite caprino, o qual necessita da aplicação de métodos de produção e beneficiamento diferenciados para que sejam oferecidos produtos melhorados ao consumidor (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008), desmistificando o leite de cabra como alimento pouco palatável, propiciando a sua expansão em âmbito nacional.

2.3 QUALIDADE DO LEITE DE CABRA *VERSUS* MASTITE CAPRINA

A qualidade do leite de cabra é definida por seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos e constitui uma exigência de mercado e da indústria beneficiadora. Práticas adequadas de higiene, manipulação e manejo, desde a obtenção do leite até sua comercialização, são de fundamental importância para garantir qualidade e segurança alimentar ao consumidor (MAGALHÃES, 2005).

A microbiota presente no leite influencia sua qualidade e de produtos derivados, e a deterioração dos mesmos é determinada pelo tipo e pela quantidade dos micro-organismos. Pesquisas sobre o tema indicaram uma grande variedade de micro-organismos, relacionada com as condições higiênico-sanitárias da ordenha, conservação do leite, tipo de processamento, tempo e temperatura de armazenamento, qualidade microbiológica da água, dentre outros fatores (GOTTARDI et al., 2008).

A sanidade da glândula mamária pode interferir na qualidade do leite produzido tanto do ponto de vista da segurança alimentar quanto no beneficiamento. A infecção da glândula mamária provoca transtornos na secreção láctea e, quanto mais grave, mais a composição do leite se aproxima da composição sanguínea, caracterizando-se por diminuição de alguns componentes físico-químicos (CORREA et al., 2010). A resposta inflamatória que se desenvolve no interior do úbere tem a finalidade de destruir ou neutralizar os agentes infecciosos e suas toxinas e permitir que a glândula mamária retome a sua produção normal. Pode ocorrer destruição de

células epiteliais, responsáveis pela síntese de constituintes do leite, com diminuição da capacidade produtiva do animal (ALMEIDA, 2009).

Desse modo, a redução da produção e da qualidade do leite devido a infecções intramamárias, as repercussões sobre os animais adultos e lactantes e a saúde do consumidor, justificam a grande necessidade em se estudar e desenvolver estratégias de controle (MOTA, 2008).

2.3.1 Etiologia da mastite caprina

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária. Pode apresentar origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo esta última a principal, destacando-se as de origem bacteriana. Sua etiologia é complexa e multivariada, o que torna necessária a identificação dos micro-organismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e a prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos (RIBEIRO et al., 2003).

Dentre os micro-organismos causadores de mastite em rebanhos caprinos, *Staphylococcus aureus* é o mais importante. A importância do *S. aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada por levantamentos epidemiológicos os quais o relacionam a toxinfecções alimentares em diversos países. Pesquisas no Brasil indicam o agente como um dos principais micro-organismos contaminantes do leite cru (CAMARA, 2002). O agente que ocasiona a intoxicação não é o micro-organismo em si, mas a enterotoxina termorresistente produzida e liberada no alimento. A intoxicação estafilocócica constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em muitos países, e os sintomas estão associados a náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, além de dor de cabeça e queda da pressão arterial (BORGES et al., 2008).

Além de *S. aureus*, diferentes agentes podem estar envolvidos na mastite caprina como: *Staphylococcus Coagulase Negativa* (SCN), *Streptococcus* spp., bastonetes Gram negativos, *Mycoplasma* spp. e o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV).

Dentre as espécies de SCN mais prevalentes em caprinos, destaca-se *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus epidermidis*, este último associado, na maioria dos casos, com elevadas contagens de células somáticas (BERGONIER et al., 2003).

Outros micro-organismos que também podem ser isolados de glândulas mamárias caprinas são *Corynebacterium* spp. e outros bacilos gram positivos, além de algumas espécies de fungos, porém com menor frequência (CONTRERAS et al., 2007; PEIXOTO et al., 2010).

2.3.2 Diagnóstico da mastite caprina

Nas formas agudas e crônicas, o diagnóstico é realizado considerando-se os sinais clínicos, como o aparecimento súbito de febre, perda de apetite, apatia, dispneia e relutância em se locomover, além das alterações visíveis no úbere, como vermelhidão e sensibilidade ao toque. Contudo, o exame clínico não pode ser utilizado como única ferramenta de diagnóstico, devendo estar associada à lactocultura (NUNES et al., 2008), principalmente pelo fato de que, em criações leiteiras de caprinos e ovinos, a frequência de mastite subclínica oscilar entre 22 e 75% (LIMA JUNIOR et al., 1995; PEIXOTO et al., 2010).

A cultura bacteriológica do leite é considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico das infecções intramamárias, no entanto, a contagem de células somáticas (CCS) constitui a base das técnicas de diagnóstico indireto das mastites em todas as espécies de ruminantes leiteiros (MOTA, 2008). Desse modo, a CCS é amplamente utilizada para a avaliação do "status" sanitário da glândula mamária.

Entende-se por células somáticas aquelas encontradas no leite e que se originam do sangue e da glândula mamária dos animais. As células somáticas presentes no leite compreendem as células epiteliais dos alvéolos (2 a 20% do total), sendo as demais (80 a 98%) conhecidas como células de defesa (leucócitos, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos). As células de defesa estão geralmente presentes em pequeno número, mas em presença de inflamação podem alcançar contagens que alcançam, em alguns casos, milhões por mililitro de leite. A taxa de mastite dos rebanhos pode ser estimada com base na contagem de células somáticas (CCS), de acordo com estudos realizados em vários países (BRITO et al., 2002).

Entre os métodos utilizados para avaliar a contagem celular, pode-se citar o "California Mastitis Test" (CMT), a contagem microscópica direta e a contagem eletrônica. A prova do CMT mede indiretamente a concentração de leucócitos no leite, sendo que, em caprinos, o CMT negativo é um bom indicador da inexistência

de infecções, enquanto que não é incomum a ocorrência de resultados falso-positivos. Tal teste é considerado a prova eleita para a avaliação de mastites subclínicas pela facilidade de execução, baixo custo e por permitir um resultado satisfatório acerca da situação da mastite em rebanhos leiteiros (MOTA, 2008).

Já a contagem eletrônica de células somáticas pode ser realizada tanto por contadores de partículas, quanto através de contadores baseados em citometria de fluxo, como o “Somacount” ou o “Fossomatic” (GOMES et al., 2004).

Assim, a CCS é utilizada como indicador de qualidade do leite, tanto para vacas como para cabras e, normalmente, a CCS no leite de cabras não infectadas é maior do que aquela presente no leite de vacas nessas mesmas condições. A CCS no leite de vacas livres de infecção intramamária é, em geral, inferior a 200.000 células/mL de leite e no leite de cabras não infectadas, inferior a 400.000 células/mL (ARCURI et al., 2004; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999;).

Essas diferenças quanto aos valores de CCS ocorrem principalmente pela grande quantidade de componente apócrino na secreção do leite de cabras. Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de estabelecer a CCS de cabras não infectadas, mas a interpretação dos resultados se torna complicado em virtude da quantidade de fatores biológicos e instrumentais que podem interferir nesse parâmetro, como: número de lactações, estágio de lactação, época do ano, manejo e tipo de ordenha (ANDRADE, 2001). Estudos indicam que a contagem de células somáticas aumenta com o avançar da lactação (GOMES et al., 2004). Park e Humphrey (1986) verificaram maiores níveis celulares nas primeiras semanas pós-parto, os quais diminuiriam durante o período de máxima produção de leite, voltando a aumentar até o final da lactação (MADUREIRA et al., 2010).

Trabalhos realizados por Ryan et al. (1993), Nord e Adnoy (1997), Sanchez et al. (2001) e Gomes et al. (2011) demonstraram que o número de células somáticas no leite de cabras reagentes ao antígeno do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) era maior do que o número de células observadas no leite de animais não reagentes. Birgel Junior et al. (2007) relataram, também, que a CCS é maior nos caprinos infectados pelo CAEV, independentemente deles apresentarem ou não mastite indurativa.

Segundo Corrales et al. (2004), outra importante causa de mastite em cabras é a infecção por *Mycoplasma* spp., a qual ocasiona uma redução abrupta da produção de leite, além de desencadear um aumento significativo da contagem de

células somáticas (CCS). Em contrapartida, De La Fe et al. (2009) não observaram diferença significativa da CCS entre rebanhos infectados e livres do micro-organismo.

No Brasil não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite de cabra e a globalização dos mercados indica que são necessárias medidas regulamentares nesse sentido. Porém, para que essas medidas sejam adequadas e justas com o setor de caprinocultura leiteira, é fundamental que estudos sobre o comportamento deste parâmetro em relação aos rebanhos nacionais sejam realizados, de modo a se determinar limites que estimulem o setor a produzir matéria prima de boa qualidade (MAGALHÃES, 2005).

Sendo assim, a CCS ainda não está bem estabelecida no diagnóstico da mastite caprina. Sugere-se que valores de CCS acima de $1,0 \times 10^3$ células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (PAES et al., 2003).

2.4 MICOPLASMAS

Micoplasmas são organismos difundidos na natureza e acometem o homem, mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. Distinguem-se de outras bactérias por seu pequeno tamanho e pela ausência de parede celular, o que possibilita a sua inclusão na classe Mollicutes (do latim *mollis*, delicado e *cutis*, parede) (RAZIN et al., 1998). Um grande número de espécies de micoplasmas tem sido isolado de animais, sendo muitas delas consideradas comensais apatogênicas que vivem nas superfícies mucosas, sobretudo nas do trato respiratório e urogenital, embora também possam acometer olhos, tubo digestivo, glândula mamária e articulações. As espécies patogênicas do gênero *Mycoplasma* foram descritas como responsáveis pelo aparecimento de diversas doenças, tais como: pleuropneumonia, pneumonia, agalaxia, vulvovaginite, mastite, artrite e poliartrite, conjuntivite e ceratoconjuntivite (DAMASSA et al., 1992).

Economicamente, as espécies mais importantes relatadas em pequenos ruminantes estão inseridas no grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM), do qual fazem parte: *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*MmmLC*), *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) e *M. bovine* sorogrupo bovino 7 (*Msp7-PG50*) (SANTOS, 2009; SANTOS et al., 2012). Em 2006, Vilei et al.

propuseram a junção de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri* em uma única subespécie por sua similaridade genética. Além dessas espécies, outras como *M. agalactiae* (*Ma*), *M. conjunctivae*, *M. arginini* e *M. ovipneumoniae*, também possuem grande importância dentre os agentes que acometem caprinos e ovinos.

Nocard e Roux, em 1898, foram os primeiros a cultivar o agente da pleuropneumonia, utilizando a técnica desenvolvida por Pasteur no final do século XIX, em meios acrescidos de uma parte de soro bovino ou de coelho para vinte partes de caldo. Em 1910, Borrel et al. foram os primeiros a cultivarem os agentes em meio sólido, descrevendo sua morfologia colonial em “ovo frito”, e confirmando que esses microrganismos só se desenvolviam na presença de soro animal (MARINHO, 2008).

No Brasil, o primeiro diagnóstico de micoplasmose foi realizado por Penha e D'ápice em 1942. Posteriormente, diferentes espécies de micoplasmas foram isoladas e identificadas em nossos rebanhos caprinos, como *M. ovipneumoniae*, no Estado do Rio de Janeiro (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1982); *Mmc*, *Mmm*LC (NASCIMENTO et al., 1986) e *M. arginini*, nos Estados do Rio Grande do Sul (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1982) e Rio de Janeiro (GOMES et al., 1994); *Ma* no Estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002) e *M. conjunctivae* no Estado de São Paulo (GREGORY et al., 2003).

Em pequenos ruminantes, os micoplasmas são associados a infecções respiratórias, mastites, artrites, doenças da esfera reprodutiva e lesões oculares. Destacam-se entre estas enfermidades a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) e a Agalaxia Contagiosa, designadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como doenças de notificação compulsória, devido ao impacto econômico que ocasionam nos rebanhos (ALMEIDA, 2009).

Para o diagnóstico das micoplasmoses utiliza-se o isolamento e a identificação dos agentes infecciosos, realizados pelo cultivo em meios específicos contendo soro animal. Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apresentam vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, aumentando a possibilidade de detecção de diferentes espécies de micoplasmas. Estudos recentes com pesquisas de anticorpos indicam que testes sorológicos,

como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), têm sido amplamente utilizados pela consistência de seus resultados (CAMPOS, 2008).

2.5 AGALAXIA CONTAGIOSA

2.5.1 Etiopatogenia e sinais clínicos

A agalaxia contagiosa (AC) é uma enfermidade infecciosa que acomete pequenos ruminantes. *Mycoplasma agalactiae* é considerado o agente clássico da doença, embora outras espécies como, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. putrefaciens* também possam produzir sinais clínicos similares (BERGONIER et al., 1997). Encontra-se mundialmente disseminada e leva ao desenvolvimento de mastite, agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite (CORRALES et al., 2007), ainda que haja relatos de animais acometidos que permanecem assintomáticos (MULLER et al., 1998; RIBEIRO et al., 1995).

AC ocorre na Europa, Ásia e África, principalmente nos países da costa do Mar Mediterrâneo. A doença clínica foi descrita primeiramente por Metaxa, em 1816, na Itália e, somente em 1925, Bridé e Donatien conseguiram cultivar *M. agalactiae* de ovelhas afetadas pela doença (AZEVEDO et al., 2006; DAMASSA et al., 1992; MADANAT et al., 2001).

No Brasil, o único diagnóstico de agalaxia contagiosa em caprinos tinha sido relatado em 1942, quando foi descrito um surto da doença ocorrido no Estado de São Paulo por Penha e D'Ápice. Todavia, naquele período, o micro-organismo isolado, apesar de apresentar características dos micoplasmas, não foi identificado. Considerando ainda, que casos de AC normalmente não cursam com pneumonia e que *M. agalactiae* fermenta a glicose, ao contrário do observado pelos autores, pôde-se deduzir que a enfermidade descrita deveu-se a outra espécie de *Mycoplasma*. Posteriormente, AC também foi identificada nos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco, com morbidade de até 100% e mortalidade em animais jovens e adultos em torno de 90% e 5%, respectivamente (AZEVEDO et al., 2006).

Sabe-se que a transmissão da agalaxia contagiosa se dá pelo contato com animais infectados, com ou sem sinais clínicos, ingestão de alimentos contaminados com secreções ou leite. A via de contágio mais comum entre animais do mesmo

rebanho é a digestória, nos lactantes, porém, as fêmeas em lactação adquirem a infecção via galactófora ascendente ou através das mãos do ordenhador, ordenhadeira mecânica, contato com materiais contaminados e por inalação. A venda de animais portadores e o contato entre os animais durante o deslocamento entre rebanhos constituem fatores de risco para a disseminação da enfermidade (ALCÂNTARA, 2010).

O período de incubação da doença varia entre uma semana e dois meses, dependendo da virulência do agente infeccioso e da resistência do hospedeiro. Animais infectados desenvolvem bacteremia seguida de febre, no entanto, a presença da bactéria no sangue é transitória. O agente infeccioso é transferido através da circulação sanguínea e após cinco dias da infecção é possível detectar *M. agalactiae* nos órgãos alvos, ou seja, glândula mamária, olhos, linfonodos, articulações e tendões, nos quais ocorre o processo inflamatório. Animais gestantes podem abortar em consequência da inflamação do útero ou podem produzir crias inviáveis (MARINHO, 2008).

A enfermidade causa grandes perdas econômicas devido à redução ou à parada abrupta da produção de leite e ao custo com o tratamento e prevenção, podendo levar os animais ao óbito. Acomete animais de ambos os sexos, determinando quadros inaparentes, leves, agudos ou crônicos. Nas fêmeas, os sinais clínicos agudos frequentemente são observados no início da lactação e se manifestam principalmente por mastite, quase sempre seguida de uma diminuição na produção do leite ou agalaxia. No conjunto dos rebanhos afetados podem ser observados sinais clínicos do tipo mamário, artrítico e/ou ocular. A ocorrência esporádica de uma forma atípica ou assintomática também já foi relatada (BERGONIER et al., 1997; CAMPOS, 2008).

2.5.2 Diagnóstico e prevenção

O diagnóstico presuntivo da enfermidade é estabelecido com base nos achados epidemiológicos e na presença de sinais clínicos, a saber: diminuição da produção de leite, mastite acompanhada por uma secreção láctea de coloração amarelo-esverdeada, ceratoconjuntivite e lesões articulares. As lesões oculares são observadas em 50% dos casos. A presença de claudicação também é comum e persiste por um longo tempo. Entretanto, se somente um sinal da doença está

presente, torna-se mais difícil fazer o diagnóstico clínico, o qual deve ser confirmado por exames laboratoriais, como o isolamento e a identificação do agente infeccioso. Leite, secreções ocular, nasal e vaginal, líquido articular, sangue e urina, são considerados os melhores espécimes clínicos para isolar o agente (CAMPOS, 2008; MARINHO, 2008).

As técnicas de inibição de crescimento, imunoperoxidase, aglutinação em lâmina e tubo, e imunodifusão têm sido relevantes no diagnóstico das micoplasmoses, tendo como principal vantagem o baixo custo de realização, além de boa sensibilidade e especificidade (NASCIMENTO et al., 1986). No entanto, outras técnicas sorológicas vem sendo padronizadas para a identificação de uma resposta imune induzida por micoplasmas, entre as quais se destaca o ELISA (DAWO; MOHAM; 2007), inclusive o ELISA indireto com proteína-G para a detecção de anticorpos anti-*M. agalactiae* em caprinos, padronizado por CAMPOS et al. (2009).

Outras técnicas para a identificação de micoplasmas, como a PCR e suas variedades, já foram descritas em diversos trabalhos, como no de Greco et al. (2001), no qual os autores descreveram uma PCR-multiplex capaz de detectar e distinguir, em uma única reação, diferentes espécies de micoplasmas relacionadas com a AC. Em 2011, Amores et al., utilizaram a PCR para detectar bodes portadores assintomáticos de AC em centros de inseminação artificial na Espanha.

Várias estratégias de prevenção são empregadas para minimizar os sinais clínicos da agalaxia contagiosa, incluindo antibioticoterapia, eutanásia e vacinação. Porém, a melhor medida para proteger os rebanhos caprinos e ovinos da AC é a adesão de medidas de higiene no pasto, limpeza regular e desinfecção das instalações, que podem ser realizadas pela utilização de diferentes produtos químicos e pelo calor (MADANAT et al., 2001). De La Fe et al. (2004) demonstraram a sensibilidade de micoplasmas frente à formalina a 0,1% durante 16 horas, e que fenol a 0,5% e 0,1 M de etileneimine binária por 24 horas também foram efetivos contra algumas espécies.

Em estudo recente, testou-se um bioterápico produzido a partir de *M. agalactiae* em caprinos clinicamente enfermos obtendo-se resultados clínicos satisfatórios e de baixo custo para o produtor. Vacinas vivas atenuadas foram também utilizadas, mas estas levantaram questionamentos relacionados com a inocuidade e eficácia, e não são permitidas em muitos países (ALCÂNTARA, 2010).

2.6 VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)

2.6.1 Etiologia e patogenia

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pertencem à família Retroviridae e subfamília Lentivirinae, sendo que o primeiro isolamento dos LVPR foi realizado por Sigurdson (1954), em ovinos. Nesse mesmo estudo, consagrou-se o termo “vírus lentos”, denominação dada por estes causarem uma infecção crônica, de evolução lenta, persistente, progressiva e degenerativa (PETURSSON et al., 1992). Os LVPR são os responsáveis pela Artrite Encefalite Caprina (CAE) e pela Maedi-Visna (MV) em ovinos (SILVA; LIMA, 2007).

O lentivírus caprino (LVC) é o agente etiológico da artrite-encefalite caprina (CAE), enfermidade crônica, incurável, de alta prevalência em rebanhos leiteiros nacionais e associada a perdas econômicas. Há grande necessidade de pesquisa dos modos de transmissão desse vírus para o delineamento eficiente de medidas de controle e possível erradicação (ANDRIOLI et al., 2006; DE ANDRES et al., 2005).

Sabe-se que as células da linhagem monócito/macrófago são as principais hospedeiras do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) *in vivo* e é nessas células que o vírus persiste por toda a vida do animal. Tem-se observado a infecção não produtiva em linfócitos (ZINK; JOHNSON, 1994), bem como a presença do RNA viral em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas e do plexo coróide (SILVA; LIMA, 2007). Estudos demonstraram que a replicação viral é dependente do nível de maturação e diferenciação da célula monocítica e, presumivelmente, a presença de monócitos/macrófagos infectados no colostro, leite, sangue e outras secreções seriam as possíveis fontes de infecção (TIGRE et al., 2006). Sabe-se, também, que cabras naturalmente infectadas com CAEV, expressam o DNA pro-viral em diversos tecidos, como útero, ovidutos e glândula mamária. A presença do lentivírus nestes tecidos pode contribuir para uma transmissão vertical da enfermidade (FIENI et al., 2003).

A infecção pelo vírus da CAE é responsável pela indução, em intensidade variada, de resposta imunológica celular e humoral, que não protegem contra a multiplicação viral. Estudos revelam resposta humoral em torno da terceira a quinta semanas após a infecção, todavia, os anticorpos neutralizantes são produzidos

tardamente, em quantidades limitadas e são de baixa afinidade, de forma que não interrompem o ciclo de replicação do vírus. A resposta celular é caracterizada pela proliferação de linfócitos responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não destroem as que não expressam o pro-vírus (CASTRO, 1998).

2.6.2 Diagnóstico

O diagnóstico de rotina da CAE é realizado principalmente por provas sorológicas indiretas, devido aos custos menos elevados quando comparadas aos testes diretos. Os testes indiretos fazem a detecção de anticorpos específicos para o antígeno, em amostras de soro sanguíneo ou outras secreções que os possuam. Dentre esses testes destaca-se a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), o “Immunoblotting” ou “Western Blot”, a Reação de Imunofluorescência Indireta, a Fixação do Complemento e o ELISA (ANDRIOLI et al., 2006; DE ANDRES et al., 2005;).

IDGA é o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e possui baixo custo, uma vez que não necessita de equipamentos nem instalações sofisticadas para ser realizado, além de ser de fácil leitura e apresentar resultado rápido. Trata-se de teste diagnóstico mais utilizado em programas de controle da doença empregados em vários países (MOOJEN, 2001). Apresenta boa especificidade, razoável sensibilidade e a técnica está fundamentada na difusão do anticorpo (Ac) e do antígeno (Ag) em uma base semi-sólida contendo gel de ágar e eletrólitos. Quando o Ac e o Ag se encontram em concentrações equivalentes, interagem e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como bandas de precipitação (BRITO, 2009). Este teste apresenta como desvantagem o fato de só detectar altos níveis de imunoglobulinas nos indivíduos, o que promove a permanência de falso-negativos no rebanho caprino (TIGRE et al., 2006). Além disso, a detecção pelo anticorpo depende do antígeno utilizado, pois tem sido demonstrado que o IDGA com a glicoproteína 135 do CAEV permite maior sensibilidade do que o teste com a proteína 28 do vírus. Um resultado negativo na IDGA não descarta uma possível infecção, pois pode ocorrer uma demora significativa entre a infecção e a produção de anticorpos, como também é possível que em alguns caprinos acometidos exista expressão insuficiente do vírus para ocasionar uma resposta humoral (BRITO, 2009; MCGUIRE et al., 1990;).

Dentre os testes sorológicos, ELISA é o que apresenta maior sensibilidade e especificidade, quando se utilizam antígenos do núcleo ou do envelope viral (DE ANDRES et al., 2005). É possível processar um grande número de amostras, sendo que a sensibilidade e especificidade do teste dependem da qualidade do antígeno. De acordo com a OIE, a produção de antígenos de qualidade satisfatória tem limitado a aplicação do ELISA como rotina para o diagnóstico do CAEV (TORRES et al., 2009).

O diagnóstico sorológico de animais infectados por CAEV é contestável, considerando-se que alguns animais podem apresentar baixos títulos de anticorpos, soroconversão tardia, ou ainda reações intermitentes de soropositividade e soronegatividade. A sorologia por IDGA, apesar de ser uma prova de baixa sensibilidade, é o teste mais amplamente utilizado para diagnosticar infecções por lentivírus (KNOWLES JUNIOR et al., 1994).

Um trabalho realizado por Adams (1982), utilizando a IDGA como teste, informa que anticorpos contra o CAEV são encontrados no sangue do animal 60-90 dias pós-infecção. Utilizando a mesma metodologia, Oliver et al. (1982), ao realizarem infecções experimentais com o CAEV em dois cabritos, verificaram que ambos já apresentavam anticorpos no soro quatro semanas após a inoculação do vírus (BERTOLINI et al., 1997).

Em relação aos testes diretos, estes incluem o isolamento e a identificação do vírus, sendo importantes no diagnóstico da infecção viral. Dentre esses testes tem-se a Imunohistoquímica e métodos de detecção de ácidos nucléicos, como a Hibridização *in situ* (HIS) e PCR, que é uma técnica bastante sensível e específica, capaz de detectar animais com infecção recente ou que ainda não soroconverteram (ANDRIOLI et al., 2006).

Técnicas moleculares de diagnóstico, principalmente a PCR, têm sido utilizadas para identificar a susceptibilidade de diferentes tipos celulares frente à infecção pelos LVPR, bem como o papel destes grupos celulares na persistência da enfermidade no organismo animal. A PCR é empregada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois ainda é um teste caro, porém, possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicada para animais cujo resultado de outros testes não tenha sido conclusivo (SILVA; LIMA, 2007).

Vários protocolos de PCR foram desenvolvidos para detectar o DNA pró-viral. Essas metodologias incluem “semi-nested”-PCR (ELTAHIR et al., 2006),

“double-nested”-PCR (BARLOUGH et al., 1994), “nested”-PCR (GREGORY et al., 2009), “real time”-PCR e “real time” RT-PCR (RAVAZZOLO et al., 2006) ou combinações entre eles. Algumas vantagens deste método são a alta sensibilidade e especificidade, a rapidez dos resultados, além da possibilidade de detectar proteínas ou ácido nucleico em amostra na qual o vírus não permanece viável. Uma desvantagem da utilização da PCR é a baixa eliminação viral após a soroconversão do animal. Por isso, essa técnica deve ser associada a testes sorológicos, tal qual a IDGA ou ELISA (DE ANDRES et al., 2005).

Estudos para a detecção do vírus da CAE pela técnica de PCR têm sido realizados em diversas amostras clínicas como células mononucleares de sangue periférico, explantes de membrana sinovial, leite, pulmão, linfonodo mesentérico, medula óssea e glândula mamária (CASTRO et al., 1999; GREGORY et al., 2011; RIMSTAD et al., 1993;). Em programas de reprodução, a PCR pode ser utilizada para testar amostras de sangue e sêmen de reprodutores negativos em testes sorológicos.

O uso da PCR em rotina de diagnóstico deve atender a certos requisitos básicos, como a rigorosa observância dos procedimentos para evitar falso-positivos, o barateamento dos testes e simplificação dos protocolos, além da validação de sua capacidade de amplificar fragmentos conservados do genoma de amostras existentes na população alvo (CASTRO, 1998). Segundo Rimstad et al. (1993) e Chebloune et al. (1996), a PCR tem ainda se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais com sinais clínicos da doença e sorologia negativa. A utilização da PCR pode agregar mais informações quanto ao diagnóstico, porém sempre associada a outras técnicas.

Um estudo realizado por Gregory et al. (2009), através das técnicas de PCR e de “nested”-PCR, associadas ao protocolo de extração de DNA por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, foi capaz de detectar o vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabras, sendo a “nested”-PCR mais sensível. Santos (2010) também indicou a “nested-PCR” do sangue como um bom método para diagnóstico do CAEV nos animais estudados, visto que conseguiu detectar o provírus em animais com resultado negativo na IDGA.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 QUEDA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA POR SURTO DE MICOPLASMOSE

Trabalho realizado a partir de resultados obtidos no projeto piloto dessa tese.

Publicado no periódico Enciclopédia Biosfera.

QUEDA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA POR SURTO DE MICOPLASMOSE

Lídia Maria Marques dos Santos ¹; Camila Serva Pereira ¹; Leandro dos Santos Machado ¹; Juliana Ferreira de Almeida ²; Elmiro Rosendo do Nascimento ³

1. Pós-Graduandos em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.
2. Professora Doutora da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.
3. Professor Doutor da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

l_msantos@yahoo.com.br - Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ, Cep: 24.230-340, Brasil

RESUMO

A Micoplasmose caprina representa um fator limitante para a caprinocultura brasileira principalmente pela queda ou parada da produção de leite e elevada morte de crias. Caprinos acometidos por espécies patogênicas de micoplasmas podem desencadear sintomatologia clínica variada: artrite ou poliartrite, conjuntivite, linfadenite, peritonite, pericardite, mastite, septicemia, pneumonia e febre. O diagnóstico pela PCR apresenta vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, a sensibilidade e a especificidade na detecção de diferentes espécies de micoplasmas. O presente estudo objetivou a detecção de *Mycoplasma* spp. pela PCR genérica, utilizando o par de primers MGSO (TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) e GPO-3 (GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T) com *amplicon* de 270 pb; detecção de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) com a utilização dos primers MAGF (CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG) e MAGR (CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C), *amplicon* de 360 pb; e detecção de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) utilizando-se os primers MMMLC2-L (CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T) e

MMMLC1-R (CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA), com *amplicon* de 1049 pb. As amostras clínicas analisadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária - UFF, 17 suabes de orofaringe e seis amostras de leite, foram provenientes de cabras durante um surto de pneumonia e agalaxia no Estado de Minas Gerais, Brasil. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e submetido à PCR genérica e à PCR espécie-específica com a utilização de diferentes pares de *primers* e ciclos. Na PCR genérica houve visualização de *amplicons* de 270pb em todas as amostras testadas, enquanto na PCR específica os resultados foram negativos para *Ma* e *Mmc*. A detecção do agente a partir de espécimes clínicos permitiu maior rapidez no diagnóstico dessa doença, fundamental para a adoção de medidas de controle e profilaxia. Concluiu-se, então, que a agalaxia não foi ocasionada por *Ma*, mas por outra espécie de micoplasma, não testada nesse estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Micoplasma, leite de cabra, agalaxia, caprino.

DROP IN MILK PRODUCTION BY GOAT MYCOPLASMOSIS OUTBREAK

ABSTRACT

Goat Mycoplasmosis is a limiting factor for dairy goats, mainly by decrease or stop in milk production, besides high death rate of offsprings. Goats affected by pathogenic species of mycoplasma may develop clinical manifestations of arthritis or polyarthritis, conjunctivitis, lymphadenitis, peritonitis, pericarditis, mastitis, septicemia, pneumonia and fever. The diagnosis by PCR has advantages over isolation, as the shortest time to obtain results and higher sensitivity and specificity in detecting different species of mycoplasmas. The present study had the objective to carry out generic PCR to detect *Mycoplasma* spp., primers used and amplicon (MGSO: TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC and GPO3: GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T for 270 bp) and specific PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) (MAGF: CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG and MAGR: CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C for 360 bp) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) (MMMLC2-L: CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T and MMMLC1-R: CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA for 1049 bp). For diagnosis, there were used 17 oropharynx swabs and six milk samples from goats during an

outbreak of pneumonia and agalactia in a herd of Minas Gerais state, Brazil. DNA was extracted by phenol-chloroform method and subjected to generic and species-specific PCR using different pairs of primers and cycles. As results, generic PCR yielded amplicons of 270 bp in all samples tested, while the specific PCR were negative for *Ma* and *Mmc*. Rapid detection of mycoplasma from clinical specimens prompt adoption of treatment, control measures and prophylaxis. It is concluded that the Agalactia was not due to *Ma*, but other mycoplasma species, different from those tested in this study.

KEYWORDS: Mycoplasma, goat milk, agalactia, goat.

INTRODUÇÃO

As micoplasmoses são enfermidades infecciosas de distribuição mundial, causadas por microrganismos da Classe Mollicutes e dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que acometem diversas espécies de animais domésticos (COTTEW, 1979). Os micoplasmas diferenciam-se fenotipicamente de outras bactérias pelo pequeno tamanho (0,3-0,8 μm) e pela ausência de parede celular. Taxonomicamente esta última característica é usada para a separação destes microrganismos na classe Mollicutes (*mollis*, mole, *cútis*, pele, em latim) (RAZIN et al., 1998; SANTOS, 2009).

A micoplasmose caprina representa um fator limitante para a caprinocultura brasileira. Os caprinos acometidos por espécies patogênicas de micoplasmas podem desencadear sintomatologia clínica variada: artrite ou poliartrite, conjuntivite, linfadenite, peritonite, pericardite, mastite, septicemia, pneumonia e febre (AZEVEDO et al., 2006).

A Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) causada pelo *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, e a Agalaxia Contagiosa, pelo *M. agalactiae*, são doenças de notificação obrigatória conforme estabelecido pela “World Organization for Animal Health” – OIE (2008), que ao lado de outras micoplasmoses são reconhecidas mundialmente como causadoras de perdas econômicas vultosas, representadas principalmente pela morte de crias e pela redução ou parada da produção de leite (ALMEIDA, 2009).

O grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) agrupa espécies e subespécies que são conhecidas por provocar uma série de enfermidades em bovinos, caprinos e

ovinos (OIE, 2008). O GMM constitui-se de seis espécies de micoplasmas estreitamente relacionadas em suas características bioquímicas e sorológicas e na filogenia do gene 16S r-RNA. As espécies e subespécies que constituem esse grupo são *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC (*MmmSC*), *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) e *M. bovine* Sorogruppo 7 (*Msp7-PG50*) (SANTOS, 2009). Contudo, *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC (*MmmLC*) e *M. mycoides* subsp. *capri* já haviam sido incluídos na mesma subespécie (VILEI et al., 2006).

Para o diagnóstico das micoplasmoses utiliza-se o isolamento e a identificação dos agentes infecciosos, realizados pelo cultivo em meios específicos contendo soro animal. Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas, como a PCR, apresentam vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, aumentando a possibilidade de detecção de diferentes espécies de micoplasmas (CAMPOS, 2008).

O presente estudo objetivou a detecção de *Mycoplasma* spp. pela PCR genérica, além de *M. agalactiae* (*Ma*) e *M. mycoides* subsp. *capri* pela PCR espécie-específica de suabes de orofaringe e leite caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras clínicas analisadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária - UFF, 17 suabes de orofaringe e seis amostras de leite, foram provenientes de cabras durante um surto de pneumonia e agalaxia no Estado de Minas Gerais, Brasil. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK, 1989) e submetido à PCR genérica e à PCR espécie-específica com a utilização de diferentes pares de *primers* e ciclos.

A reação de amplificação do DNA foi realizada em termociclador Px2 Thermal Cycler. Para *Mycoplasma* spp. utilizou-se a seguinte programação: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 10 minutos e término a 4 °C. Para *Mycoplasma agalactiae*: 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 57 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por 1 minuto; extensão final a 70 °C por 10 minutos e término a 4 °C. Para *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* foi utilizado o ciclo: 96 °C por 3 minutos; 30

ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 49 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos; extensão final a 72 °C por 5 minutos e término a 4 °C.

Cada tubo de reação continha: 61,5 µL de água para PCR, 10µL de Tampão PCR 10X, 4µL de MgCl₂, 5µL de dNTPmix, 2U de Taq DNA polimerase e 2µL de cada *primer* (Prodimol Biotecnologia S/A). Para *Mycoplasma* spp. foram usados dois pares de *primers*: GPO-3 (5`- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T -3`) e MGSO (TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) para a reprodução de *amplicon* de 270 pb (KUPPEVELD et al., 1992). Para *M. agalactiae* se utilizou os *primers* MAGF (CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG) e MAGR (CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C) com a geração de *amplicon* de 360 pb (CHÁVEZ-GONZÁLEZ, 1995). Para *M. mycoides* subsp. *capri* foram utilizados os *primers* MMMLC2-L (CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T) e MMMLC1-R (CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA), com *amplicon* de 1049 pb (MONNERAT et al., 1999).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e a visualização dos *amplicons* foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na PCR genérica houve visualização de *amplicons* de 270pb em todas as amostras testadas (Figura 1), enquanto na PCR específica os resultados foram negativos para *Ma* e *Mmc*.

De acordo com a literatura, a agalaxia pode ser ocasionada por outros micoplasmas, além do *M. agalactiae* (OIE, 2008). Em caprinos, *Ma* é o agente clássico causador dessa enfermidade, embora *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*) e *M. putrefaciens* (*Mp*) também possam estar presentes (AMORES et al., 2011; AZEVEDO et al., 2006).

Por outro lado não é comum a visualização de problemas respiratórios em surtos ocasionados por *Ma*, sendo mais frequente, portanto, o aparecimento de agalaxia, mastite e poliartrite. Dessa forma, não é raro caprinos infectados por *Mmc* apresentarem pneumonia (AZEVEDO et al., 2006; GRECO et al., 2001).

Estudos adicionais estão em curso, a fim de elucidar a etiologia micoplásmica do presente surto.

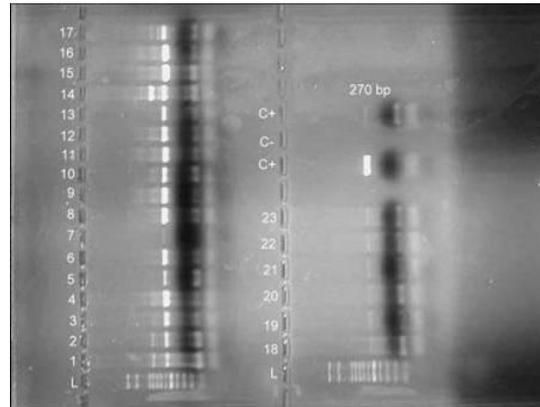


Figura 1 Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV. PCR de swab de orofaringe (1-17) e leite (18-23), sendo L: marcador DNA Ladder; 1 a 23: amostras positivas com bandas de 270 pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

CONCLUSÕES

O diagnóstico de micoplasmose por meio da PCR permitiu o controle imediato do surto em questão. Não houve confirmação de que a agalaxia foi devida ao *M. agalactiae*. Apesar de manifestações respiratórias presentes no rebanho afetado, não houve detecção de *M. mycoides* subsp. *capri*.

Outras espécies de micoplasmas, diferentes das testadas nesse estudo, podem causar as manifestações clínicas descritas e dessa forma, serem a causa etiológica desse surto.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura**. Niterói, 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; DE la FE, C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. **Theriogenology**, v. 75, p. 1265-1270, 2011.

AZEVEDO, E. O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.M.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.DO.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. Contagious Agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 576-581, 2006.

CAMPOS, A. C. **ELISA proteína-G para o diagnóstico de Agalaxia Contagiosa dos ovinos e caprinos**. Recife, 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y.; BASCUNANA, C. R.; BOLSKE, J. G.; MATTSON, J. B.; MOLINA, C. F.; JOHANSSON, K. E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 183-190, 1995.

COTTEW, G. S. Caprine - ovine *Mycoplasmas*. In: TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F. *The Mycoplasmas*. Human and animal *Mycoplasmas*. **Academic Press**, London, p. 103-132, 1979.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, p. 21-25, 2001.

KUPPEVELD, F. J. M.; LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, H. G. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2606-2615, 1992.

MONNERAT, M. P.; THIAUCOURT, F.; POVEDA, J. B.; NICOLET, J.; FREY, J. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC e *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 2, p. 224-230, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE), Contagious Caprine Pleuropneumonia. In **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines**, 5 ed. 1000-12, 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA. 1989.

SANTOS, S. B. **Imunoperoxidase e métodos moleculares na detecção de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: *Mycoplasmataceae*) em conduto auditivo de bovinos e em *Raillietia* spp. (Gamasida: *Raillietidae*)**. Seropédica, 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

VILEI, E. M.; KORCZAK, B. M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. **Veterinary Research**, v. 37, p. 779-790, 2006.

3.2 INFECÇÃO POR *Mycoplasma agalactiae* EM REBANHO CAPRINO LEITEIRO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.

Enviado para o periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Infecção por *Mycoplasma agalactiae* em rebanho caprino leiteiro no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Infection by *Mycoplasma agalactiae* in a dairy goat herd in Rio de Janeiro state, Brazil

Lídia Maria Marques dos Santos^{1*}, Camila Serva Pereira¹, Felipe Faccini dos Santos¹, Gabriel Maksoud Greco², Ana Cláudia Campos³, Edisio Oliveira de Azevedo⁴, Roberto Soares de Castro³, Maria Lúcia Barreto¹, Juliana Ferreira de Almeida¹, Elmiro Rosendo do Nascimento¹

¹Universidade Federal Fluminense - Rua Vital Brasil Filho, 64, CEP:24.230-340. Niterói, RJ.

*E-mail: l_msantos@yahoo.com.br

²Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – Botucatu, SP

³Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE

⁴Universidade Federal de Sergipe – Aracaju, SE

ABSTRACT

Mycoplasma agalactiae is the main causative agent of sheep and goat Contagious Agalactia, which has been diagnosed in the Brazilian northeast. Infection can be diagnosed by bacterial isolation or by more sensitive methods, such as Polymerase Chain Reaction (PCR) and ELISA. In this study, *M. agalactiae* was investigated by isolation, indirect immunoperoxidase, PCR, indirect ELISA and sequencing in a dairy goat located in São Gonçalo city, Rio de Janeiro state, Brazil. Milk and serum of 20 goats were collected. In order to perform mycoplasma isolation, milk samples were inoculated in Hayflick modified media. Isolates were identified using indirect immunoperoxidase test with anti-serum to *M. agalactiae*. DNA from milk samples was processed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and subjected to PCR for *Mycoplasma* spp. and *M. agalactiae* with visualization of, respectively, 510-520 bp and 360 bp amplicons. Surveys were also conducted using an indirect ELISA to *M. agalactiae* and *M. bovis*, due to the latter and *M. agalactiae* genome similarities. Positive isolates for *M. agalactiae* were sequenced and interpreted by Lasergene SeqMan Pro (DNASTAR) program. Of all animals studied, 10% (2/20) were positive by isolation, confirmed by indirect immunoperoxidase and 20% (5/20) by PCR. Positive isolates were identified as *M. agalactiae* by sequencing. On *M. bovis* ELISA, all 20 goats were negative. Of all analyzed samples, 85% (17/20) yielded anti-*M. agalactiae* antibodies. Under

Chi-square test, ELISA was more sensitive ($P < 0.05$) to detect positive animals than isolation and PCR. To our knowledge, this is the first description of *M. agalactiae* infecting goats in Rio de Janeiro. This agent has only been previously isolated from goats in the Brazilian states of Paraíba, Rio Grande do Norte and Pernambuco, which are located in the northeastern region. This finding corroborates the need for research of *M. agalactiae* in goat herds located in the southeastern region of Brazil.

KEYWORDS: Contagious agalactia, *Mycoplasma agalactiae*, goat, ELISA, PCR

Mycoplasma agalactiae é o principal agente causador da agalaxia contagiosa, enfermidade infecciosa diagnosticada no nordeste brasileiro. Outras espécies podem estar relacionadas com a doença, uma vez que já foram descritas associações com dois ou mais micoplasmas, a saber: *M. mycoides* subesp. *capri* (*Mcc*), *M. agalactiae* (*Ma*) e *M. arginini* (De la Fe *et al.*, 2005); e *M. agalactiae* com *M. putrefaciens* (Gil *et al.*, 2003).

A agalaxia contagiosa ocorre na Europa, Ásia e África, principalmente nos países da costa do Mar Mediterrâneo (Azevedo *et al.*, 2006). A doença clínica foi descrita primeiramente na Itália por Metaxa, em 1816. Apenas em 1925, Bridé e Donatien conseguiram cultivar *M. agalactiae* de ovelhas acometidas pela doença (Madanat *et al.*, 2001).

Já no Brasil, o primeiro relato da doença em cabras foi registrado em 1942 no Estado de São Paulo por Penha e D'Apice, sem que houvesse isolamento de *M. agalactiae*. Somente em 2001, Azevedo *et al.* (2006) isolaram tal agente através de dois surtos de ACOC que ocorreram no Estado da Paraíba. A enfermidade causa grandes perdas econômicas devido à redução ou à parada abrupta da produção de leite e ao custo com o tratamento e prevenção, podendo levar ao óbito. Acomete animais de ambos os sexos, determinando quadros inaparentes, leves, agudos ou crônicos, podendo ocasionar mastite, agalaxia, poliartrite, ceratoconjuntivite e, ocasionalmente, aborto e pneumonia.

O diagnóstico é baseado nos achados epidemiológicos, sinais clínicos e por meio de exames laboratoriais. Este pode ser obtido através do isolamento do agente em meios ricos em esteróis ou com auxílio de testes mais sensíveis, como ELISA e PCR.

Neste estudo, *M. agalactiae* foi pesquisado tanto a partir do leite quanto do sangue de um rebanho localizado no município de São Gonçalo, região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, onde 20 cabras lactantes da raça Saanen, sem sintomatologia aparente, foram

investigadas por meio das seguintes técnicas: isolamento, imunoperoxidase indireta, PCR, ELISA indireto e sequenciamento.

O isolamento de *Mycoplasma* spp. foi realizado pela inoculação de 0,2 mL de leite em meio sólido Hayflick modificado e 0,2 mL de leite em 2,0 mL de meio Hayflick líquido modificado, seguido de incubação a 37 °C por até 10 dias em ambiente de microaerofilia. Foi realizada avaliação diária da presença ou não de colônias típicas no formato de “ovo frito” ou “mamilar” em microscópio estereoscópico. A identificação de *M. agalactiae* foi realizada com o auxílio de provas bioquímicas e imunoperoxidase indireta modificada.

Para a imunoperoxidase indireta, as placas contendo meio sólido Hayflick modificado foram incubadas por 48 horas. Em cada placa, áreas com colônias típicas foram selecionadas, marcadas e cobertas com IgG de coelho anti-*M. agalactiae*, anti-*M. capricolum* e anti-*M. arthritidis*, na diluição de 1/20. Em seguida, as placas foram incubadas a 4 °C, durante a noite. Na manhã subsequente, as áreas foram cobertas com soro de cabra anti- IgG de coelho, conjugada com peroxidase na diluição de 1:80, seguido de nova incubação a 37°C por 3 horas. Posteriormente, as placas foram submetidas à lavagem com tampão (TBS, soro de cavalo e Tween 20) e cobertas com solução de revelação (metanol gelado, 4-chloro-1-naphthol, TBS e peróxido de hidrogênio 30%) por 30 minutos ou até o surgimento de cor violeta escuro na área da reação (Imada *et al.*, 1987). Por fim, a solução de revelação foi descartada e as placas avaliadas sob microscópio estereoscópico.

Para PCR, a extração de DNA de cada amostra de leite foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, segundo Gregory *et al.* (2009). Após a extração, o DNA foi concentrado em álcool etílico e centrifugado. O sedimento foi ressuspensionado em tampão Tris-EDTA pH 8,3 (Sambrook *et al.*, 1989) e estocado a -20 °C.

A reação de amplificação do DNA (Tab. 1) foi realizada em termociclador "Thermo Electron Corporation" com a seguinte programação: 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 90 segundos e extensão final de 72 °C por 7 minutos, com visualização de amplicon de 510-520 pb para o gênero *Mycoplasma*.

Para a PCR de *M. agalactiae* utilizou-se o seguinte ciclo: 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 68 °C por 1 minuto e extensão final a 70 °C por 10 minutos, com visualização de amplicon de 360 pb.

Os produtos obtidos na PCR, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

O ELISA-G foi realizado conforme Campos *et al.* (2009). Para produção do antígeno, *M. agalactiae* foi cultivado, identificado e submetido à sonicação de baixa intensidade em meio líquido por 20 minutos. Para a determinação da concentração proteica, utilizou-se albumina sérica bovina como padrão. Empregou-se como substrato o conjugado de proteína G-peroxidase e peróxido de hidrogênio, adicionado de tetra-metil benzidina (TMB). A leitura da densidade óptica foi conduzida com filtro de 450 nm.

ELISA indireto para *M. bovis* também foi utilizado para testar os 20 soros caprinos obtidos, conforme descrito por Mesquita (2013).

O sequenciamento foi efetuado a partir de isolados tipificados através da imunoperoxidase indireta e PCR-específica para *M. agalactiae*, interpretado pelo programa Lasergene SeqMan Pro (DNASTAR).

Tabela 1. Sequência dos *primers* para a PCR de *Mycoplasma* spp. e *M. agalactiae*.

Primer	Sequência	Referência
M. sppF1	CGCCTGAGTAGTACGTTCCGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppF2	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppF3	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppF4	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppF5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppF6	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppR1	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppR2	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Uphoff e Drexler, 2002
M.sppR3	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Uphoff e Drexler, 2002
MagF	CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG	Chávez-González <i>et al.</i> , 1995
MagR	CCGTCAAGGTAGCGTCATTCCTAC	Chávez-González <i>et al.</i> , 1995

Dos animais estudados, 20% (5/20) foram positivos na PCR-genérica e específica (Fig.1), sendo que dois daqueles PCR positivos, o que corresponde a 10% (2/20), foram também positivos no isolamento seguido de imunoperoxidase indireta. Os isolados, tipificados na imunoperoxidase indireta como *M. agalactiae*, foram confirmados pelo sequenciamento, pois o fragmento amplificado apresentou 100% de identidade com cepas de *M. agalactiae* disponíveis no NCBI (BLAST®). No ELISA para *M. bovis*, realizado em função da similaridade entre *M. agalactiae* e *M. bovis*, todos os 20 caprinos testados foram negativos. Dos soros analisados, 85% (17/20) apresentaram anticorpos anti-*M. agalactiae* no ELISA-G indireto. Pelo qui-quadrado, o teste de ELISA foi mais sensível na detecção de animais positivos ($P < 0.01$) quando comparado às demais técnicas.

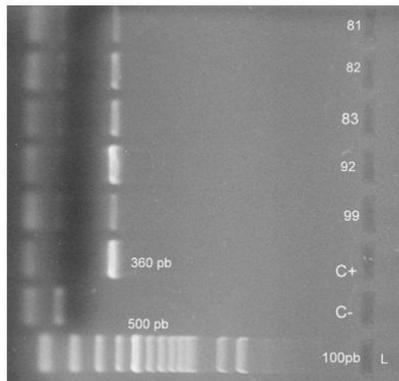


Figura 1. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV. PCR para *M. agalactiae*, sendo: 81, 82, 83, 92 e 99: amostras positivas com banda de 360 pb; C+: cepa de referência *M. agalactiae* GM 139; C-: controle negativo; L: marcador DNA Ladder em 100 pb.

Resultados discordantes de positividade entre a sorologia e o isolamento se devem às limitações de ambas as técnicas, além do fato do isolamento do gênero *Mycoplasma* ser considerado uma técnica laboriosa e demorada, uma vez que requer até 21 dias para a visualização das colônias. Um fator limitante para o cultivo inclui a acidificação progressiva do leite, que pode reduzir a viabilidade do micoplasma, já que uma alta porcentagem de bactérias cresce em meio ágar seletivo, prejudicando sua identificação (Tola *et al.*, 1997).

Em relação à maior sensibilidade do ELISA frente à PCR, De La Fe *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes. Estes autores propõem que isto se deve à excreção intermitente do agente, à baixa sensibilidade dos testes microbiológicos, ao uso de antimicrobianos na terapia dos animais e à persistência de altos títulos de anticorpos.

Vale ressaltar que casos de reação-cruzada podem ocorrer entre *M. agalactiae* e outras espécies de micoplasmas que apresentam grande similaridade genética, como o *M. bovis*, causando dificuldades na identificação precisa do agente etiológico (Chávez-González *et al.*, 1995). Por isso, há a necessidade de se realizar o sequenciamento para evitar diagnósticos errôneos, conforme realizado no presente trabalho. Adicionalmente, a negatividade dos caprinos ao ELISA para *M. bovis* neste estudo, confirmou tratar-se de infecção por *M. agalactiae*.

Os animais positivos para *Mycoplasma agalactiae* no presente trabalho não apresentavam qualquer sintomatologia clínica no momento da coleta. Normalmente, rebanhos que apresentaram surtos anteriores permanecem sem expressão clínica por um período, em virtude da imunidade naturalmente adquirida pela infecção. Os pequenos ruminantes são os únicos hospedeiros sensíveis atuando como reservatório e ainda não se sabe quanto tempo a imunidade persiste nos animais naturalmente infectados, de modo que a sobrevivência do micro-organismo no meio ambiente é importante para a disseminação da enfermidade (Campos *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2003).

Dessa forma, pôde-se relatar a primeira ocorrência de *M. agalactiae* no Estado do Rio de Janeiro e fora da região nordeste brasileira, uma vez que tal agente só havia sido isolado de caprinos dos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. Tal achado corrobora com a necessidade da pesquisa de *M. agalactiae* em outros rebanhos caprinos localizados na região sudeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B; NASCIMENTO, E.R. et al. Contagious Agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.576-581, 2006.

CAMPOS, A.C.; TELES, J.A.A.; AZEVEDO, E.O. et al. Elisa protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Res.*, v.84, p.70-75, 2009.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y.; BASCUNANA, C.R.; BOLSKÉ, J.G. et al. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.*, v.47, p.183-190, 1995.

DE LA FE, C.; ASSUNCAO, P.; ANTUNES, T. et al. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Vet. J.*, v.170, p. 257-259, 2005.

GIL, M.C.; PEÑA, F.J.; MENDOZA, J.H. et al. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, v.50, n.10, p.484-487, 2003.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C. et al. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabra pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested-PCR. *Ars Vet.*, v. 25, n.3, p.142-146, 2009.

IMADA, Y.; UCHIDA, I.; HASHIMOTO, K. Rapid identification of *Mycoplasma* by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, p.17-21, 1987.

MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPISIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet. Brno.*, v.70, p.403-412, 2001.

MESQUITA, S.M.C. *ELISA indireto para diagnóstico de Mycoplasma bovis em amostras de soro sanguíneo e leite bovino*. Niterói, 2013. 49f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.2, Cap.14.

TOLA, S.; ANGIOI, A.; ROCCHIGIANI, A.M.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; LEORI, G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v.54, p.17-22, 1997.

UPHOFF, C.C.; DREXLER, H.G. Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia*, v. 16, p. 289-293, 2002.

3.3 ISOLAMENTO BACTERIANO E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

Enviado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.

Isolamento bacteriano e Contagem de Células Somáticas em leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina

Lídia M.M. Santos¹, Camila S. Pereira¹, Leandro S. Machado¹, Gabriel M. Greco², Wilker Menezes¹, Juliana F. Almeida¹, Roberto S. Castro³, Elmiro R. Nascimento¹

ABSTRACT.- Santos L.M.M., Pereira C.S., Machado L.S., Almeida, J.F., Greco, G.M., Menezes W., Castro R.S. & Nascimento E.R. 2014. [**Bacterial isolation and somatic cell count in milk from goats naturally infected by caprine arthritis encephalitis virus.**] Isolamento bacteriano e Contagem de Células Somáticas em leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: l_msantos@yahoo.com.br

Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) is a chronic, multisystemic and progressive lentiviral disease characterized by pneumonia, encephalitis, arthritis, weight loss and mastitis, even though animals often act as asymptomatic carriers. The aim of the present study was to compare three different diagnostic techniques for CAE detection: AGID and nested-PCR on blood and milk, correlating their results with bacterial isolation and somatic cell count (CCS), which are mammary gland health markers. Blood and milk were obtained from 138 dairy-goats from nine caprine herds in Rio de Janeiro state, Brazil. Milk samples were cultured in 5% sheep blood agar and eosin methylene blue agar, incubated at 37 °C. Milk CCS was determined by cytometry flow (Somacount 300® - Bentley Instruments, USA). A commercially available AGID test (Biovetech®, Brazil) was used for serological diagnosis. Blood and milk nested-PCRs were conducted using extraction and amplification protocols previously described in literature. From all animals analyzed, 47.83% (66/138) tested positive for at least one of the three CAE diagnostic techniques. Seven of nine herds (77.78%) had at least one animal positive to CAE. All infected animals were asymptomatic. AGID was more sensitive ($P < 0.05$), with 43.48% (60/138) of positivity, followed by blood nested-PCR, 26.81% (37/138) and milk nested-PCR, 10.87% (15/138). Mean CCS was of 2,272,000 cells/mL of milk. Sixty-two (62/115) goats had CCS higher than 1,000,000 cells/mL of milk. CAE infection did not influence CCS ($P > 0.05$); negative and positive animals showed 2,311,000 and 2,224,200 cells/mL of milk, respectively. From all samples submitted to bacterial isolation, half were positive (50%; 69/138). Animals testing positive and negative for bacterial isolation had similar mean CCS ($P > 0.05$), of 1,942,000 and 2,389,000 cells/mL of milk, respectively. No correlation ($P > 0.05$) was found between CAE infection and bacterial isolation. We concluded that CCS results should be evaluated with care, for they have no correlation with bacterial isolation and CAE infection, nor serve as criteria to detect subclinical mastitis in goats.

INDEX TERMS: Caprine Arthritis Encephalitis, milk goat, AGID, nested-PCR, bacterial isolation.

RESUMO.- A artrite encefalite caprina (CAE) é considerada uma enfermidade crônica multissistêmica e progressiva, a qual possui como agente etiológico um lentivírus e se caracteriza por ocasionar pneumonia, encefalite, artrite, emagrecimento e mastite, embora, muitas vezes, nenhum sintoma esteja presente. O objetivo deste estudo foi comparar três diferentes métodos de diagnóstico para a infecção pelo vírus da CAE: IDGA, "nested"-PCR do sangue e "nested"-PCR do leite, correlacionando seus resultados com indicadores de saúde do úbere, o isolamento bacteriano e a contagem de células somáticas (CCS) do leite. Foram coletados sangue e leite de 138 cabras de nove rebanhos leiteiros localizados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino e em ágar EMB ("Eosin Methylene Blue"), seguido de incubação a 37 °C. A CCS do leite foi realizada através do método de citometria de fluxo, em aparelho Somacount 300 - Bentley Instruments, EUA®. A análise sorológica foi realizada pela IDGA, por meio do Kit Biovetech®(Recife, PE), enquanto que as

Recebido em

Aceito para publicação em

¹ Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. *Autor para correspondência: l_msantos@yahoo.com.br

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil.

³ Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil.

“nested”-PCRs do sangue e do leite foram conduzidas seguindo-se protocolos de extração e amplificação previamente descritos na literatura. Das cabras analisadas, 47,83% (66/138) apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos três testes para diagnóstico da CAE. Houve pelo menos um animal positivo em sete dos nove rebanhos estudados (77,78%). Não foram observados sintomas clínicos de mastite ou artrite. A IDGA mostrou-se o teste mais sensível ($P < 0,05$), com 43,48% (60/138) de positividade, seguido da “nested”-PCR do sangue, 26,81% (37/138) e “nested”-PCR do leite, 10,87% (15/138). A CCS média foi de 2.272.000 células/mL de leite, sendo que 53,91% (62/115) das cabras apresentaram CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite. Animais negativos e positivos para a CAE apresentaram CCS média similar ($P > 0,05$), de 2.311 mil e 2.242 mil células/mL de leite, respectivamente. Metade das amostras (50%; 69/138) foram bacteriologicamente positivas frente ao isolamento. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a CCS média de animais negativos e positivos no isolamento, de, respectivamente, 1.942 e 2.389 mil células/mL. Não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre a positividade para CAE e o isolamento bacteriano. Concluimos que a CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano ou com a positividade para CAE, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras. Termos de indexação: Artrite Encefalite Caprina, leite de cabra, IDGA, “nested”-PCR, isolamento bacteriano

INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pertencem à família Retroviridae e subfamília Lentivirinae (Franke 1998), sendo os responsáveis pela Artrite Encefalite Caprina (CAE) e pela Maedi-Visna (MV) em ovinos (Silva & Lima 2007).

A CAE é considerada uma enfermidade crônica multissistêmica e progressiva, caracterizada por pneumonia, encefalite, artrite, emagrecimento e mastite, embora, muitas vezes, nenhum sintoma esteja presente. O impacto econômico da doença depende de fatores relacionados ao ambiente, raça, susceptibilidade individual, sistema de produção, dentre outros (Ramírez et al. 2013).

O diagnóstico de rotina da CAE baseia-se em provas sorológicas (indiretas), as quais são muito utilizadas devido a seu baixo custo, em comparação aos testes diretos. Os testes indiretos consistem na detecção de anticorpos específicos para o antígeno, em amostras de soro sanguíneo ou outras secreções que os possuam. A Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) é o teste indireto recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico da enfermidade, por ser barato, de fácil e rápida leitura e execução. Por outro lado, apresenta como desvantagem o fato de só identificar indivíduos com altos níveis de imunoglobulinas, o que favorece a permanência de animais falso-negativos no rebanho (Tigre et al. 2006).

Em relação aos testes diretos, o isolamento e a identificação do vírus são considerados importantes no diagnóstico da infecção. Métodos moleculares de diagnóstico, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizados para identificar a susceptibilidade de diferentes tipos celulares frente à infecção pelos LVPR, bem como o seu papel na persistência da enfermidade no organismo animal. A PCR é considerada uma técnica bastante sensível e específica, capaz de detectar animais com infecção recente ou que ainda não soro-converteram (Andrioli et al. 2006).

Diferentes protocolos de PCR foram desenvolvidos para detectar o DNA pró-viral, como: “semi-nested”-PCR (ELTAHIR et al., 2006), “double-nested”-PCR (Barlough et al. 1994), “nested”-PCR (Gregory et al. 2009), “real time”-PCR e “real time”-RT-PCR (Ravazzolo et al. 2006). Algumas vantagens deste método são a alta sensibilidade e especificidade, a rapidez dos resultados, além da possibilidade de detectar proteínas ou ácido nucleico em uma amostra na qual o vírus está inviável. Uma desvantagem da técnica está relacionada com a baixa eliminação viral após a soroconversão do animal e por isso preconiza-se a realização concomitante testes sorológicos, tal qual IDGA ou ELISA (De Andres et al. 2005, Reina et al. 2009).

Em levantamento recente sobre a infecção pelo vírus da CAE em rebanhos caprinos leiteiros no estado do Rio de Janeiro, Moreira et al. (2007) identificaram, pela IDGA, prevalência de 14,1%. Ao ocasionar emaciação progressiva, artrite, pneumonia e mastite, esta infecção parece interferir negativamente sobre a produtividade do rebanho leiteiro. Por isto, nos casos específicos em que a glândula mamária está acometida, de forma clínica ou subclínica, é importante realizar o diagnóstico diferencial com infecções bacterianas.

As principais bactérias envolvidas na mastite caprina são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Coagulase Negativa*, *Streptococcus* spp., bastonetes Gram negativos e *Mycoplasma* spp. Para o diagnóstico da mastite, emprega-se rotineiramente o “California Mastitis Test” (CMT) e a Contagem de Células

Somáticas (CCS), sobretudo na infecção de caráter subclínico, sendo o cultivo de leite utilizado na identificação do agente etiológico (National... 1999, Peixoto et al. 2010).

O resultado da CCS se vale como indicador de qualidade do leite tanto para vacas como cabras. Em média, a CCS no leite de vacas livres de infecções intramamárias varia entre 40.000 e 80.000 células/mL de leite. Já em relação ao leite de cabras livres desse tipo de patologia, a contagem varia de 50.000 a 400.000 células/mL. O principal fator que contribui para a CCS mais elevada no leite de cabra é a maneira como este é secretado pela glândula mamária, de forma apócrina. Nesse caso, o produto de secreção (leite) é liberado junto com pequena parte da célula. O aumento no comércio internacional de produtos lácteos tem levado muitos países, especialmente da União Européia, a desenvolver padrões rígidos para a CCS. Por esse motivo, o limite para esta contagem gera grande preocupação para produtores de cabras e processadores de leite. Tem-se buscado reduzir o atual padrão da CCS do leite de cabra de 1.000.000 células/mL para 750.000 células/mL (Zeng 1996, Souza et al. 2007).

O objetivo do presente estudo foi comparar três diferentes métodos de diagnóstico para a infecção pelo CAEV: IDGA, "nested"-PCR do sangue e "nested"-PCR do leite, correlacionando seus resultados com o isolamento bacteriano e a CCS do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram coletados leite e sangue de 138 cabras das raças saanen e parda alpina em diferentes estágios de lactação, de nove rebanhos leiteiros localizados nos seguintes municípios do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica, Niterói, Teresópolis, Friburgo, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin, Tanguá e Valença. Para a CCS foram utilizadas amostras de leite provenientes de 115 cabras.

A seleção dos rebanhos analisados foi feita por conveniência (amostragem não probabilística), porém em cada rebanho os animais foram selecionados ao acaso.

As frequências obtidas pelos diferentes métodos de diagnóstico foram avaliadas estatisticamente pelos testes qui-quadrado, exato de Fisher, regressão logística simples e t-student ($P < 0,05$).

Isolamento bacteriano

Das amostras de leite coletadas assepticamente conforme instruções do "Nacional Mastitis Council" (1999), uma parte foi transferida para frascos estéreis devidamente identificados e transportados em caixa isotérmica com gelo para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, a fim de serem processados para o cultivo em um período de até 24 horas após a coleta.

As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino e em ágar EMB ("Eosin Methylene Blue"), seguido de incubação a 37 °C, realizando-se leituras após 24 e 48 horas. Nos cultivos contendo mais de cinco colônias com uma única morfologia, procedeu-se a avaliação de características de crescimento (tamanho e coloração das colônias, bem como produção de hemólise), coloração de Gram e identificação dos isolados a partir de provas bioquímicas (National... 1999, McDougall et al. 2001).

Contagem de Células Somáticas

Aproximadamente 40 mL do leite coletado foram dispensados em frasco padronizado com o conservante Bronopol[®], acondicionado em caixa isotérmica com gelo e encaminhados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora/MG, para a realização da CCS. Para tal análise foi utilizado o método de citometria de fluxo, em aparelho Somacount 300 - Bentley Instruments EUA[®].

Diagnóstico da CAE

Para a detecção do CAEV pela "nested"-PCR utilizou-se aproximadamente 1,0 mL do leite de cada cabra obtido no momento da coleta. Todas as amostras foram acondicionadas em microtubos e mantidas a -20°C até a realização da técnica.

O sangue foi coletado por venopunção jugular: metade do volume acondicionado em tubo de ensaio para a obtenção de soro, necessário para a técnica de IDGA, enquanto o restante foi dispensado em tubo com o anti-coagulante EDTA para a realização da "nested"-PCR.

A análise sorológica foi realizada pela IDGA, por meio do Kit Biovetech® (Recife, PE)

Para a "nested"-PCR do sangue utilizou-se protocolo de extração determinado por Sambrook et al. (1989), e para a "nested"-PCR do leite foi empregada técnica descrita por Gregory et al. (2009).

Na amplificação do DNA foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos (Quadro 1), determinados a partir da região gag da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli et al. 1990, Andrioli et al. 2006), com a obtenção de "amplicon" de 185pb (Rimstad et al. 1993, Andrioli et al. 2006). A reação consistiu de um volume total de 50µL e os reagentes obedeceram às concentrações segundo Barlough et al. (1994), contendo: tampão Tris HCl 10mM; KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; dNTPmix (100µM de cada desoxirribonucleotídeo); 20 pmol de cada *primer* (ciclo 1: oligos P1 e P2; ciclo 2: oligos P3 e P4); Taq DNA polimerase (2UI); DNA da amostra: 3µL no ciclo 1 e 1µL de produto do ciclo 1 no ciclo 2, sendo o volume final completado com água livre de DNase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador ("Thermo Electron Corporation") com as seguintes etapas: 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 45 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos obtidos na PCR, juntamente com o marcador de peso molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Houve pelo menos um animal positivo em sete dos nove rebanhos estudados (77,78%). Não foram observados sintomas clínicos de mastite ou artrite nas cabras avaliadas.

Dos animais estudados, 47,83% (66/138) apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos três testes para diagnóstico da CAE. A IDGA mostrou-se o teste mais sensível ($P < 0,05$), com 43,48% (60/138) de positividade, seguido da "nested"-PCR do sangue, com 26,81% (37/138) e "nested"-PCR do leite, com 10,87% (15/138). Dos animais positivos, apenas 9,10% (6/66) não foram detectados pela IDGA, sendo 3,03% (2/66) positivos por ambas as técnicas de "nested"-PCR e 6,06% (4/66) pela "nested"-PCR do sangue. Nenhum animal apresentou resultado positivo somente pela "nested"-PCR do leite. Das cabras testadas, 2,17% (3/138) foram positivas em ambos os exames de PCR e somente 5,07% (7/138) nos três testes. Estes resultados encontram-se sumarizados no quadro abaixo (Quadro 2).

A CCS média foi de 2.272.000 células/mL de leite, sendo que 53,91% (62/115) das cabras apresentaram CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite. Animais negativos e positivos para a CAE apresentaram CCS média similar ($P > 0,05$) de 2.311 mil e 2.242 mil células/mL de leite, respectivamente.

Metade das amostras (69/138) foram positivas no isolamento bacteriano. Da mesma forma, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre a CCS média de animais negativos e positivos no isolamento, de, respectivamente, 1.942 e 2.389 mil células/mL.

Também não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre a positividade para CAE e o isolamento bacteriano.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a prevalência de 43,48% encontrada para a CAE pela IDGA foi substancialmente superior às relatadas em rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro, de 21,07% (Cunha & Nascimento 1995) e 14,1% (Moreira et al. 2007).

A baixa concordância entre IDGA e PCR do sangue verificada neste trabalho está em acordo com Tigre et al. (2006). Estes autores observaram que nove animais positivos na IDGA foram negativos na "double nested"-PCR do sangue. Isto pode ser explicado pelos seguintes fatores relacionados à amostra de sangue: baixo número de cópias do DNA proviral integrado, quantidade insuficiente de células infectadas e a baixa carga viral de animais aparentemente saudáveis, em função dos altos títulos de anticorpos presentes (Rutkoski et al. 2001). Outra característica importante é o alto poder de mutagenicidade do CAEV, estimado em uma mutação para cada 100.000 nucleotídeos, diminuindo consideravelmente a eficácia da PCR na detecção do provirus e dificultando a seleção de "primers" de regiões conservadas do genoma (De Andres et al. 2005). Além disso, deve-se considerar que, diferentemente do que ocorre para os outros lentivírus indutores de imunodeficiência, o CAEV não infecta linfócitos e sim monócitos, os quais constituem apenas 10% da população leucocitária total (Gendelman et al. 1985). A fraca co-relação entre

os resultados obtidos utilizando-se testes sorológicos e a PCR também foi evidenciada anteriormente tanto no sangue (Barquero et al. 2011) quanto no leite (Barquero et al. 2013).

Resultados discordantes aos verificados nesse trabalho foram relatados por Santos (2010), o qual foi capaz de identificar o CAEV pela PCR do sangue em animais sorologicamente negativos pela IDGA. Segundo Andrioli et al. (2006), tal achado se justifica pelo fato do nível de anticorpos circulantes variar entre animais e no mesmo animal, conforme seu estado fisiológico, ou ainda, pela possibilidade de se tratar de fase precoce da infecção, na qual muitos animais podem permanecer soronegativos por períodos variados. Na IDGA, há reação positiva somente na existência de determinado nível de anticorpos, possibilitando a ocorrência de resultados falso-negativos. Essa afirmação justificaria a existência, no presente estudo, de seis animais soronegativos com resultado positivo em uma das reações de "nested"-PCR.

A transmissão do CAEV pelo leite é considerada a principal via de eliminação do vírus pelo organismo. Em estudo realizado por Gregory et al. (2009), as técnicas de PCR e de "nested"-PCR, associadas ao protocolo de extração de DNA por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, foram capazes de detectar o CAEV em amostras de leite de cabras, sendo a "nested"-PCR mais sensível. Tais autores obtiveram 22,2% de positividade na "nested"-PCR do leite, resultado superior aos 10,87% encontrados nesse trabalho, utilizando-se a mesma metodologia. A fim de aumentar a sensibilidade desta técnica de extração e obter maior quantidade de DNA pró-viral de células mononucleares, Barlough et al. (1994) sugerem a centrifugação prévia do leite em baixa velocidade e uma separação em gradiente de densidade. A discrepância entre os resultados obtidos por Barlough et al. (1994) de 41% de cabras positivas através da "double-nested"-PCR tanto no leite quanto no sangue contra os 2,17% deste trabalho (Quadro 2), pode ser justificada pela aplicação deste protocolo de extração em amostras de leite.

Caldart et al. (2011) testaram três diferentes métodos para a extração do DNA genômico (DNAg) de sangue e leite de caprinos e obtiveram resultados similares aos do presente estudo, com DNA extraído a partir do sangue apresentando melhores resultados. Em seu estudo, a média de reações positivas de PCR das amostras de sangue e leite foi de, respectivamente, 60,48% e 48,19%. Dessa forma, tal resultado pode ser indicativo da presença de fatores inibidores no leite que nenhum dos três métodos foi capaz de eliminar, confirmando maior sensibilidade da técnica de PCR quando utilizadas amostras de sangue. Rimstad et al. (1993) e Extramiana et al. (2002) também verificaram que a sensibilidade da técnica de PCR é inferior quando se utiliza amostras de leite ao invés de sangue. Todavia, Barquero et al. (2011) descreveram resultados contrários, com maior sensibilidade do leite frente ao sangue. Esta variação de sensibilidade conforme a natureza da amostra pode ser decorrente dos seguintes fatores: carga viral, "primer" utilizado e mutagenicidade do vírus, fase da lactação e da infecção. A importância do "primer" na sensibilidade da PCR foi recentemente evidenciada por Barquero et al. (2013). Estes autores verificaram a influência nos resultados ao compararem dois diferentes "primers" para LVPR: 53,85% contra 7,69% de sensibilidade.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a CCS de animais positivos e negativos para CAE neste trabalho. Resultados similares foram obtidos por Nord e Adnoy (1997), Barcelos et al. (2008) e Almeida et al. (2013). Por outro lado, diversos autores observaram aumento significativo da CCS em fêmeas caprinas reagentes aos testes de ELISA e IDGA (Turin et al. 2005, Birgel Junior et al. 2007, Brito 2009, Correa et al. 2010). A discrepância entre os dados presentes na literatura pode ser explicada pelas diferentes metodologias empregadas. Nos trabalhos em que houve diferença significativa entre a CCS de animais positivos e negativos para CAE, somente um rebanho foi avaliado. Por outro lado, quando a amostragem é mais abrangente, envolvendo animais de diferentes rebanhos, a CCS entre os animais reagentes e não reagentes não difere. Sabe-se que a variação de CCS no leite de cabras se deve a uma série de fatores: o estágio da lactação, época do ano e tipo de ordenha. Ao monitorarem um rebanho caprino durante quatro estágios de lactação, Leitner et al. (2010) verificaram que a infecção pelo CAEV somente altera diversos parâmetros do leite em animais de primeira lactação, que ainda não soroconverteram.

Não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre a CCS de animais positivos e negativos para o isolamento bacteriológico neste estudo. Estes resultados estão de acordo com trabalhos previamente publicados (Santos et al. 2004, Villanova et al. 2008, Correa et al. 2010, Neves et al. 2010, Almeida et al. 2013). Diante desses resultados, deve-se avaliar com cautela a viabilidade dos testes que quantificam a celularidade no leite caprino para o monitoramento da saúde do úbere, uma vez que a quantidade de células somáticas é diretamente influenciada por fatores fisiológicos, como o processo de secreção do tipo apócrina, o estágio da lactação, a época do ano e o tipo de ordenha (Neves et al. 2010). Da mesma forma, resultados positivos no isolamento bacteriano devem ser analisados cuidadosamente, pois a mera presença de bactérias no leite não significa obrigatoriamente mastite. Para tanto, uma complementação ao isolamento seria a utilização da Contagem Total de Bactérias (CTB), capaz de avaliar de forma mais fidedigna a presença ou não de infecção mamária.

No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite caprino e, em contrapartida, a globalização dos mercados indica que medidas regulamentares nesse sentido são necessárias. Desse modo, a CCS ainda não está bem estabelecida no diagnóstico da mastite caprina, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (Paes et al. 2003). Neste estudo, a CCS média foi de 2.272.000 células/mL de leite, ultrapassando o valor máximo sugerido por Zeng (1996). Entretanto, está próximo dos 2.000.000 células/mL de leite propostos por Rota et al. (1994) como o limite de células fisiologicamente admissíveis no leite caprino. Madureira et al. (2010) propuseram a utilização de outro método para a quantificação de células somáticas no leite de cabras e empregaram dois métodos diretos para contagem de células somáticas: através da citometria de fluxo e por meio da contagem microscópica pela coloração com verde de metil e γ -pironina. Estes autores obtiveram resultados mais confiáveis com a segunda técnica. Além disso, os mesmos apontam a necessidade de se calibrar os contadores automáticos com leite de cabra, uma vez que os valores das contagens celulares realizadas em aparelho calibrado com leite de vaca podem ser até 27,3% maiores do que os obtidos na condição citada anteriormente, o que super estimaria o resultado real da contagem de células somáticas no leite caprino.

Estudos indicam que a infecção da mama pelo CAEV poderia causar uma imunossupressão seletiva devido a alterações nas funções dos macrófagos, o que ocasionaria uma maior predisposição às infecções bacterianas (Smith & Cutlip 1988, Ryan et al. 1993). No entanto, nesse estudo, não se evidenciou correlação ($P > 0,05$) entre a positividade para CAE frente ao isolamento bacteriano, em acordo com Sánchez et al. (2001), Birgel Junior et al. (2007), Leitner et al. (2010) e Bezerra Junior (2011).

CONCLUSÕES

Concluimos que a CAE se trata de uma doença altamente disseminada, cujo método diagnóstico de eleição é a IDGA, especialmente para o monitoramento inicial do rebanho. A PCR, em especial a "nested"-PCR do sangue, auxilia ao identificar animais que ainda não soroconverteram, evidenciando falso-negativos, apesar do leite ser considerado a principal via de eliminação do CAEV. Desta forma, o emprego combinado de ambas as técnicas permitiria melhor diagnóstico e controle no rebanho.

Ainda, concluimos que a CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano ou com a positividade para CAE, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida J.F., Aquino M.H.C., Magalhães H., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Ferreira T., Barreto M.L. 2013. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arq. Inst. Biol.* 80(1):13-18.
- Andrioli A., Souza K.C., Pinheiro R.R. & Sousa F.M.L. 2006. Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue. Comunicado Técnico Embrapa. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/533316/1/cot72.pdf>>. Acesso em 14 fev. 2014.
- Barcelos B., Silva C.P.C., Gomes V. & Madureira K.M. 2008. Efeito da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina na contagem total e diferencial dos leucócitos no leite de cabras. *Anuário da produção de iniciação científica discente*, vol. XI, n.12, 69-77.
- Barlough J., East N., Rowe J.D., Vanhoosear K., De Rock E., Bigornia L. & Rimstad E. 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods.* 50:69-77.
- Barquero N., Arjona A., Domenech A., Tournal C., De Las Heras A., Fernandez-Garayzabal J.F., Ruiz-Santa-Quiteria J.A. & Gomez-Lucia E. 2011. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet. Rec.* 168(1):20.

- Barquero N., Domenech A., Arjona A., Fernandez-Garayzabal J.F. & Ruiz-Santa-Quiteria J.A. 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 94:817-819.
- Bezerra Junior R.S. 2011. Influência da artrite encefalite caprina (CAE) nas características físico-química e microbiológica do leite e análise histológica da glândula mamária. Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. 60p.
- Birgel Junior E.H., Cestari V., Sampaio R.M., Lara M.C.C.S.H., Birgel D.B., Raimondo R.F.S., Brandespin F.B. & Birgel E.H. 2007. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. *Arqs Inst. Biológico.* 74:199-206.
- Brito R.L.L. 2009. Implicações da Artrite Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE. 109p.
- Caldart E.T., Chiappetta C.M., Lopes E.F. & Ravazzolo A.P. 2011. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. *Acta Scient. Vet.* 39:945-951.
- Correa C.M., Michaelsen R., Ribeiro M.E.R., Pinto A.T., Zanela M.B. & Schmidt V. 2010. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. *Acta Scient. Vet.* 38:273-278.
- Cunha, R.G & NASCIMENTO, M.D. 1995. Antibodies occurrence to caprine arthritis-encephalitis virus in goat sera from Rio de Janeiro State (Brazil). *Rev. Bras. Med. Vet.* 17(2):72-75.
- De Andres D., Klein D., Watt N.J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B.A. & Harkiss G.D. 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microb.* 107:49-62.
- Eltahir Y.M, Dovas C.I., Papanastassopou-Lou M., Koumbati M., Giadinis N., Verghese-Nikolakali S. & Koptopoulos G. 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J. Virol. Methods.* 135:240-246.
- Extramiana A.B., Gonzalez L., Cortabarría N., Garcia M. & Juste R.A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rumin. Res.* 44:109-118.
- Franke C.R. 1998. Uma virose emergente ameaça o rebanho caprino nacional: Artrite-Encefalite Caprina (CAE). *Revista Bahia Agrícola.* 2(3):89-92.
- Gendelman H.E., Narayan O. & Molineaux S. 1985. Slow persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7086-7090.
- Gregory L., Lara M.C.C.S.H., Villalobos E.M.C., Hasegawa M.Y., Castro R.S., Rodrigues J.N.M., Araújo J., Keller L.W. & Durigon E.L. 2009. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR. *ARS Vet.* 25(3):142-146.
- Leitner G., Krifucks O., Weisblit L., Lavi Y., Bernstein S. & Merin U. 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet. J.* 183:328-331.
- Madureira K.M., Gomes V., Castro R.S., Kitamura S.S. & Araújo W.P. 2010. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras hípidas. *Pesq. Vet. Brasil.* 30(4):311-316.
- McDougall S., Murgough P., Pankey W., Delaney C., Barlow J. & Scruton D. 2001. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin. Res.* 40:245-254.

- Moreira M.C., Oelemann W.M.R. & Lilembaum W. 2007. Dados sorológicos da artrite encefalite caprina no estado do Rio de Janeiro (BR) e avaliação do uso do índice clínico como ferramenta de diagnóstico. *Rev. Bras. Med. Vet.* 29(2):51-53.
- National Mastitis Council. 1999. Diagnostic procedures. Laboratory handbook on bovine mastitis. 222p.
- Nord K. & Adnoy T. 1997. Effects of infection by caprine arthritis encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.* 80(10):2391-2397.
- Neves P.B., Medeiros E.S., Sá V.V., Camboim E.K.A., Garino Jr. F., Mota R.A. & Azevedo S.S. 2010. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 30:379-384.
- Paes P.R.O., Lopes S.T.A., Lopes R.S., Kohayagawa A., Takahyra R.K., Langoni H. 2003. Effects of administration of vitamin E on mammary health and milk cell counts of first parturition goats experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55(1):15-20.
- Peixoto R.M., Mota R.A., Costa M.M. 2010. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30:754-762.
- Ramírez H., Reina R., Amorena B., De Andres D. & Martínez H.A. 2013. Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses.* 5:1175-1207.
- Ravazzolo A.P., Nenci, C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-ruff G., Peterhans E. & Bertoni G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology.* 350:116-127.
- Reina R., Berritua E., Lujan L., Juste R., Sanchez A., De Andres D. & Amorena B. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet. J.* 182:31-37.
- Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., DeRock E. & Pedersen N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infectious in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54:1858-1862.
- Rota A.M., Rojas A., Martin L., Rodriguez P. & Tovar J.J. 1994. Uso de la prueba de califórnia para detección de mamitis en el ganado caprino. *Avances en Alimentacion y Mejora Animal.* 2:67-69.
- Rutkoski J.K., Werenicz R., Reischak D., Wendolstein A.C., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 2001. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia de polimerase com "primers" degenerados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53:635-640.
- Ryan D.P., Greenwood P.L. & Nichols P.J. 1993. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. *J. Dairy Res.* 60(3):299-306, 1993.
- Saltarelli M., Querat G., Konings D.A.M., Vigner R. & Clements J.E. 1990. Nucleotide sequence and transcription analyses of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology.* 179:347:364.
- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 1989. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 999p.
- Sanchez A., Contreras A., Corrales J.C. & Marco J.C. 2001. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. *Vet. Rec.* 148(23):711-714.
- Santos A.R., Scherer S. & Schmidt V. 2004. Contagem de células somáticas e "California Mastitis Test" como método diagnóstico da mamite em caprinos. *Revta de Ciênc. Agrov.* 3:50-55.

- Santos L.M.M. 2010. Contagem de células somáticas em leite de cabra versus artrite encefalite caprina por IDGA e PCR. Dissertação de Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 61p.
- Silva J.B.A. & Lima P.M. 2007. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Vet. Brasilica*. 1(4), 111-117.
- Smith M.C. & Cutlip R. 1988. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193(1)63:67.
- Souza G.N., Faria C.G., Moraes L.C.D & Rubiale L. 2007. Contagem de Células Somáticas (CCS) em leite de cabra. *Panorama do Leite, Embrapa Gado de Leite, ano 2, n.10*. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade10.html>>. Acesso em 17 fev. 2014.
- Tigre D.M., Campos G.S. & Sardi S.I. 2006. Isolamento e identificação do vírus da artrite encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 5(2):124-131.
- Turin L., Pisoni G., Giannino M.L., Antonini M., Rosati S., Ruffo G. & Moroni P. 2005. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rumin. Res.* 57:73-79.
- Villanova M., Gonçalves M., Osório M.T.M., Esteves R. & Schmidt V. 2008. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras saanen. *Acta Scient. Vet.* 36:235-240.
- Zeng S.S. 1996. Comparisons of goat milk standards with cow milk standards of analyses somatic cell count, fat, and protein in goat milk. *Small Rumin. Res.* 21:221-225.

Quadros

Quadro 1. "Nested"-PCR para a detecção do lentivírus caprino (CAEV) em sangue e leite.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos	Posição genômica	Nº Pares base
P1 *	5'CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG3'	953-975	23pb
P2 *	5'TCCTACCCCATTAATTTGATCCAC3'	1249-1226	24pb
P3 **	5'GTTCCAGCAACTGCAAAACAGTAGCAATG3'	997-1024	28pb
P4 **	5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3'	1181-1154	27pb

* Barlough et al., 1994

** Rimstad et al. 1993

Fonte: Andrioli et al., 2006.

Quadro 2. Positividade para CAE na PCR do leite, PCR do sangue e IDGA

Testes	Cabras positivas	Cabras negativas
IDGA	43,48% (60/138) ^a	56,52% (78/138)
PCR do sangue	26,81% (37/138) ^b	73,19% (101/138)
PCR do leite	10,87% (15/138) ^{c d}	89,13% (123/138)
PCR do sangue e IDGA	16,67% (23/138) ^c	83,33% (115/138)
PCR do leite e IDGA	4,35% (6/138) ^e	95,65% (132/138)
PCR do leite e PCR do sangue	2,17% (3/138) ^e	97,83% (135/138)
PCR do leite, PCR do sangue e IDGA	5,07% (7/138) ^{d e}	94,93% (131/138)

^{a b c d e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

3.4 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA SOBRE O ISOLAMENTO BACTERIANO, CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS CAPRINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Enviado para o periódico Ciência Rural.

**Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina sobre o isolamento bacteriano,
contagem total de bactérias e contagem de células somáticas em rebanhos caprinos no
estado do Rio de Janeiro**

Lídia Maria Marques dos Santos^I Camila Serva Pereira^I Raquel Gouvêa^I Gabriel Maksoud

Greco^{II} Helena Magalhães^{III} Juliana Ferreira de Almeida^I Roberto Soares de Castro^{IV}

Elmiro Rosendo do Nascimento^I

RESUMO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença debilitante e progressiva, caracterizada clinicamente por artrite, encefalite, mastite, emagrecimento e pneumonia, embora grande parte dos animais seja assintomática. A IDGA é o exame diagnóstico recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal para o seu monitoramento. A CAE parece interferir negativamente na produção leiteira e por isto, nos casos específicos em que a glândula mamária está acometida, é importante realizar o diagnóstico diferencial com infecções bacterianas. As principais bactérias envolvidas na mastite caprina são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), *Streptococcus* spp., bastonetes Gram negativos e *Mycoplasma* spp. Para o diagnóstico da mastite, emprega-se rotineiramente a Contagem de Células Somáticas (CCS), sendo que outras técnicas podem ser utilizadas, tal qual a Contagem Total de Bactérias (CTB). O objetivo deste trabalho foi verificar a infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) através da IDGA, correlacionando-a com o isolamento bacteriano, CTB e CCS de leite de caprinos do Estado do Rio de Janeiro. Foram coletados leite e sangue de 71 cabras clinicamente sadias das raças Saanen e Parda alpina em cinco rebanhos leiteiros, em diferentes estágios de lactação. As frequências obtidas foram avaliadas estatisticamente pelos testes de regressão linear simples, regressão logística simples e concordância pelo índice Kappa ($P < 0,05$). A análise sorológica foi realizada pela IDGA, por meio do Kit Biovetech[®] (Recife, PE). As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino e em ágar EMB (“Eosin Methylene Blue”), seguido de incubação a 37°C. A CCS e a CTB foram avaliadas através da citometria de fluxo. Houve pelo menos um animal positivo nos cinco rebanhos estudados. Dos animais analisados, 56,34% (40/71) apresentaram anticorpos contra o CAEV e 47,89% (34/71) foram positivos no cultivo bacteriano, sendo mais frequente SCN (53,49%). Não houve correlação entre a positividade para CAE e o isolamento ($P > 0,05$). A CCS média foi de 2.113.000 células/mL de leite. Não houve correlação ($P > 0,05$) entre a CCS elevada frente à positividade para CAE e à

^IUniversidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil. E-mail: l_msantos@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^{III}Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), Niterói, RJ, Brasil.

^{IV}Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

positividade no isolamento bacteriano. A CTB média foi de 947.000 UFC/mL de leite. Não houve correlação ($P>0,05$) entre a CTB e a soropositividade para o CAEV, tampouco entre a CTB e o cultivo bacteriano. Em contrapartida, o coeficiente de correlação entre CTB e CCS foi de 0,72 ($P<0,05$), evidenciando forte associação entre ambos. Sugere-se que a CTB pode ser utilizada em complementação ao isolamento bacteriano para avaliação da saúde da glândula mamária de cabras. A CAE constitui uma enfermidade já disseminada pelos rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro, sendo necessárias medidas de saneamento nos rebanhos acometidos.

Palavras-chave: CAE, IDGA, mastite, CCS, CTB

ABSTRACT

Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) is a progressive disease clinically characterized by arthritis, encephalitis, mastitis, pneumonia and chronic weight loss, although many animals remain as asymptomatic carriers. AGID is the recommended diagnostic tool by the World Organisation for Animal Health (OIE). CAE infection seems to impair milk production and, therefore, when the mammary gland is involved, differential diagnosis with bacterial mastitis is needed. Caprine mastitis is most commonly caused by the following bacteria: *Staphylococcus aureus*, Coagulase Negative Staphylococci (CNS), Gram-negative Bacilli and *Mycoplasma* spp. Somatic Cell Count (SCC) values are commonly used to detect mastitis, although other tests can be performed, such as Total Bacterial Count (TBC). The aim of the present study was to diagnose CAE infection through AGID and correlate these findings with caprine milk bacterial isolation, TBC and CCS. Blood and milk was obtained from 71 Saanen and Alpine healthy goats in different stages of lactation, from five dairy herds in Rio de Janeiro state, Brazil. Results were statistically analyzed through simple linear and logistic regression and Kappa index of reliability ($P<0.05$). Milk samples were cultured in 5% sheep blood agar and eosin methylene blue agar, incubated at 37 °C. CCS and TBC were determined by cytometry flow. A commercially available AGID test (Biovetech®, Brazil) was used for serological diagnosis. CAE-infected goats were present in all five herds. Of all animals analyzed, 56.34% (40/71) tested positive to CAE and 47.89% (34/71) to bacterial isolation, in which CNS was more prevalent (53.49%). No correlation was found between CAE infection and bacterial isolation ($P>0.05$). Mean CCS was 2,133,000 cells/mL of milk. No correlation was detected ($P>0.05$) between SCC and positivity to CAE or bacterial isolation. Mean TBC was 947,000 CUF/mL of milk. No correlation ($P>0.05$) between TBC, CAE and bacterial isolation was identified. On the other hand, TBC and SCC showed high association and a 0.72 correlation coefficient. In order to evaluate caprine mammary gland health status, TBC should be used in association with bacterial isolation. Obtained results show that CAE is a highly spread infectious disease in Rio de Janeiro caprine herds and that sanitation measures are necessary.

Key words: CAE, AGID, mastitis, SSC, TBC

INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença debilitante e progressiva, sem tratamento específico, responsável por causar considerável perda econômica ao criador (MOREIRA et al., 2007). A enfermidade é ocasionada por um retrovírus pertencente à subfamília Lentivirinae, o qual, juntamente com o vírus causador da Maedi-visna em ovinos,

constituem os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). Caracteriza-se clinicamente por artrite, encefalite, mastite, emagrecimento e pneumonia, embora em grande parte das infecções, nenhum sinal clínico esteja presente.

No Brasil, o primeiro relato da CAE foi registrado em 1986 no estado do Rio Grande do Sul por Moojen e colaboradores, os quais identificaram os anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) pela técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). A IDGA é o exame diagnóstico recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Possui como vantagens baixo custo, uma vez que não necessita de equipamentos nem instalações sofisticadas para ser realizado, além de ser de fácil leitura e rápido resultado. Trata-se do teste diagnóstico mais utilizado em vários países nos programas de controle da doença (MOOJEN, 2001).

Em levantamento sobre a infecção pelo CAEV em rebanhos caprinos leiteiros no estado do Rio de Janeiro, CUNHA & NASCIMENTO (1995) e MOREIRA et al. (2007) identificaram, pela IDGA, prevalências de 21,07% e 14,1%, respectivamente. Ao ocasionar emaciação progressiva, artrite, pneumonia e mastite, esta infecção parece interferir negativamente sobre a produtividade do rebanho leiteiro. Por isto, nos casos específicos em que a glândula mamária está acometida, de forma clínica ou subclínica, é importante realizar o diagnóstico diferencial com infecções bacterianas.

As principais bactérias envolvidas na mastite caprina são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), *Streptococcus* spp., bastonetes Gram negativos, *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma* spp. (CONTRERAS et al., 2001; BERGONIER et al., 2003). Para o diagnóstico da mastite, emprega-se rotineiramente o “California Mastitis Test” (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS), sobretudo na infecção de caráter subclínico, sendo o cultivo de leite utilizado na identificação do agente etiológico (NMC, 1999; PEIXOTO et al., 2010). No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a

CCS no leite caprino, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (PAES et al., 2003). No entanto, também podem ser utilizadas outras técnicas para a avaliação da contaminação do leite caprino, tal qual a Contagem Total de Bactérias (CTB), expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro de leite (UFC/mL), com valor máximo de 500.000 UFC/mL para o leite de cabra cru (BRASIL, 2000). Muito embora a cultura bacteriológica do leite seja considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico das infecções mamárias, o CTB poderia avaliar de maneira mais fidedigna a presença ou ausência de mastite, uma vez que a mera existência de bactérias no leite não significa obrigatoriamente a presença de mastite.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi verificar a infecção pelo CAEV através da IDGA, correlacionando estes resultados com o isolamento bacteriano, CTB e CCS de leite oriundo de rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados leite e sangue de 71 cabras das raças Saanen e Parda alpina em diferentes estágios de lactação de cinco rebanhos leiteiros localizados nos seguintes municípios do Estado do Rio de Janeiro: Friburgo, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin e Tanguá.

A seleção dos rebanhos analisados foi feita por conveniência (amostragem não probabilística), porém em cada rebanho os animais foram selecionados ao acaso.

As frequências obtidas pelos diferentes métodos de diagnóstico foram avaliadas estatisticamente pelos testes de regressão linear simples, regressão logística simples e concordância pelo índice Kappa ($P < 0,05$).

Diagnóstico da CAE

O sangue de cada animal foi coletado por venopunção jugular e acondicionado em tubo de ensaio para a obtenção de soro. A análise sorológica foi realizada pela IDGA, por meio do Kit Biovetech® (Recife, PE).

Isolamento Bacteriano

Das amostras de leite coletadas assepticamente conforme instruções do “Nacional Mastitis Council” (1999), uma parte foi transferida para frascos estéreis devidamente identificados e transportados em caixa isotérmica com gelo para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, a fim de serem processados para o cultivo em um período de até 24 horas após a coleta.

As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino e em ágar EMB (“Eosin Methylene Blue”), seguido de incubação a 37°C, realizando-se leituras após 24 e 48 horas. Nos cultivos contendo mais de cinco colônias com uma única morfologia, procedeu-se a avaliação de características de crescimento (tamanho e coloração das colônias, bem como produção de hemólise), coloração de Gram e identificação dos isolados a partir de provas bioquímicas (National..., 1999; McDougall et al., 2001).

Contagem de Células Somáticas (CCS)

Coletou-se aproximadamente 40 mL de leite por cabra. Este foi dispensando em frasco padronizado com o conservante bronopol®, acondicionado em caixa isotérmica com gelo e encaminhado ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz

de Fora/MG, para a realização da CCS. Para tal análise foi utilizado o método de citometria de fluxo, em aparelho Somacount 300 - Bentley Instruments EUA[®].

Contagem Total de Bactérias (CTB)

Coletou-se aproximadamente 40 mL de leite por cabra. Este foi dispensado em frasco padronizado contendo pastilha de conservante azidiol[®], acondicionado em caixa isotérmica com gelo e encaminhado ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora/MG. Para tal análise foi utilizado o método de citometria de fluxo, em aparelho Bactocount IBC - Bentley Instruments EUA[®].

RESULTADOS

Houve pelo menos um animal positivo para CAE nos cinco rebanhos estudados. Não foram observados sinais clínicos de mastite ou artrite nas cabras avaliadas.

Dos animais analisados, 56,34% (40/71) apresentaram anticorpos contra o CAEV e 47,89% (34/71) foram positivos no cultivo bacteriano. Foram obtidos 43 isolados a partir das 71 amostras de leite de cabra *in natura* cultivadas, sendo mais frequente SCN, 53,49% (23/43), seguido de bastonetes Gram negativos, 20,93% (9/43), *Streptococcus* spp., 6,98% (3/43), *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), 6,98% (3/43), *Enterococcus* spp., 6,98% (3/43) e *Bacillus* spp., 4,65% (2/43). Não houve correlação entre a positividade para CAE e o isolamento ($P > 0,05$).

A CCS média foi de 2.113.000 células/mL de leite, sendo que 39,44% (28/71) das cabras apresentaram CCS superior a 1.000.000 de células/mL de leite. Não houve correlação

($P > 0,05$) entre a CCS elevada frente à positividade para CAE e à positividade no isolamento bacteriano.

A CTB média foi de 947.000 UFC/mL de leite, com 26,76% (19/71) das amostras apresentando resultados acima de 500.000 UFC/mL de leite. Não houve correlação ($P > 0,05$) entre a CTB e a soropositividade para o CAEV, tampouco entre a CTB e o cultivo bacteriano. Em contrapartida, o coeficiente de correlação entre CTB e CCS foi de 0,72 ($P < 0,05$), evidenciando forte associação entre ambos os testes.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, *Staphylococcus Coagulase Negativa* (SCN) foi a bactéria isolada com maior frequência no cultivo bacteriológico (53,49%), corroborando com trabalhos previamente publicados (WHITE & HINCKLEY, 1999; CONTRERAS et al., 2001; BERGONIER et al., 2003; ALMEIDA, 2009; PEIXOTO et al., 2010). O caráter oportunista dos SCN está relacionado com deficiências no sistema de ordenha e no asseio pessoal do ordenhador (CONTRERAS et al., 2001). Segundo CORRALES et al. (1997), *Streptococcus* spp. não constituem um grupo de bactérias prevalentes em criatórios caprinos, estando associados com 5-10% das mastites, o que está de acordo com os 6,98% obtidos neste estudo. Por outro lado, as frequências de 6,98% observadas para SCP e *Enterococcus* spp. foram superiores às analisadas por ALMEIDA (2009), de, respectivamente, 1,9% e 0,9%. Em relação aos bastonetes Gram positivos, *Bacillus* spp. estão raramente associados com mastites caprinas (CONTRERAS et al., 2001), muito embora tenham representado 4,65% das bactérias isoladas nesse estudo. Por fim, a alta frequência de bastões Gram negativos (20,93%) parece estar relacionada com condições de contaminação ambiental e com a utilização de utensílios mal higienizados durante a ordenha. Ainda que na literatura esses patógenos estejam

relacionados com quadros de mastite clínica aguda em cabras, não se evidenciou, nesse estudo, sinais clínicos de infecção intramamária nos animais avaliados.

A prevalência de 56,34% encontrada para a CAE pela IDGA foi superior às relatadas em rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro, de 21,07% (CUNHA & NASCIMENTO, 1995) e 14,1% (MOREIRA et al., 2007). Diante do grande número de animais positivos, não há dúvidas em afirmar que se trata de uma enfermidade endêmica, já disseminada pelos rebanhos caprinos localizados no Estado. Apesar da IDGA ser uma técnica de simples execução e a de eleição para o monitoramento inicial de rebanhos caprinos, sugere-se que seja sempre associada a testes diretos, tal qual a PCR, de modo a permitir a detecção de animais com soroconversão tardia (falso-negativos nos testes sorológicos). Desse modo, a combinação da IDGA com um teste direto, muito provavelmente teria elevado ainda mais a prevalência para CAE obtida nesse estudo. Diante disso, são necessárias medidas de saneamento emergenciais nos rebanhos acometidos.

Não houve correlação entre a CCS de animais positivos e negativos para CAE neste trabalho. Resultados similares foram obtidos por NORD & ADNOY (1997), BARCELOS et al. (2008) e ALMEIDA (2009). Por outro lado, diversos autores observaram aumento significativo da CCS em fêmeas caprinas reagentes aos testes de ELISA e IDGA (TURIN et al., 2005; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; BRITO, 2009; CORREA et al., 2010). A discrepância entre os dados presentes nos diferentes estudos pode ser explicada pelos seguintes fatores associados à contagem de células somáticas em cabras: fisiologia da secreção láctea (do tipo apócrina), período de lactação, raça e tipo de ordenha. Além disso, os trabalhos supracitados que associam a positividade para CAE com alterações no leite caprino foram gerados a partir da análise de apenas um rebanho. Sugere-se que tal correlação não é encontrada quando mais de um rebanho é avaliado.

Estudos indicam que a infecção da mama pelo CAEV poderia causar uma imunossupressão seletiva devido a alterações nas funções dos macrófagos, o que ocasionaria uma maior predisposição às infecções bacterianas (SMITH & CUTLIP, 1988; RYAN et al., 1993). No entanto, nesse estudo, não se evidenciou correlação entre a positividade para CAE frente ao isolamento bacteriano, em acordo com SÁNCHEZ et al. (2001), BIRGEL JUNIOR et al. (2007), LEITNER et al. (2010) e BEZERRA JUNIOR (2011).

Também não houve correlação entre a CCS de animais positivos e negativos para o isolamento bacteriológico. Estes resultados concordam com trabalhos previamente publicados (SANTOS et al., 2004; VILLANOVA et al., 2008; CORREA et al., 2010; NEVES et al. 2010). Em contrapartida, ao se utilizar a CTB como método de avaliação da contaminação do leite demonstrou-se haver correlação com a CCS. Neste estudo, 26,76% (19/71) das amostras de leite de cabra cru estavam acima dos 500.000 UFC/mL de leite preconizado pela legislação, valor superior aos 6,9% relatados por BEZERRA JUNIOR (2011). Embora haja poucos estudos quanto à utilização da CTB como parâmetro de avaliação da qualidade do leite de cabra, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que esse método deve ser utilizado com maior frequência. Diante disto, para uma avaliação mais completa da saúde da glândula mamária caprina, recomenda-se que seja associada ao isolamento e à CCS. Enquanto que a CTB quantifica o número de bactérias presentes, o isolamento identifica o agente etiológico e a CCS estima a reação inflamatória em resposta a uma suposta infecção, reduzindo a possibilidade de um diagnóstico impreciso.

No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite caprino, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (PAES et al., 2003). Neste estudo, a CCS média foi de 2.113.000 células/mL de leite, ultrapassando o valor máximo recomendado por ZENG

(1996). Entretanto, está próximo dos 2.000.000 células/mL de leite propostos por ROTA et al. (1994) como o limite de células fisiologicamente admissíveis no leite caprino.

CONCLUSÕES

Staphylococcus Coagulase Negativa foi o agente bacteriano isolado com maior frequência nas amostras de leite, confirmando ser este o principal grupo de micro-organismos isolados de úberes caprinos.

Houve correlação positiva entre a CTB e a CCS, sugerindo que a CTB pode ser utilizada em complementação ao isolamento bacteriano em estudos de avaliação da saúde da glândula mamária de cabras. A associação de CTB, isolamento e CCS reduziria a possibilidade de um diagnóstico impreciso.

Não houve correlação entre a positividade para CAE e a CCS, positividade para CAE e isolamento bacteriano, tampouco entre CCS e o isolamento.

Diante do grande número de animais positivos obtidos neste trabalho, não há dúvidas em afirmar que a CAE constitui uma enfermidade endêmica, já disseminada pelos rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro. Desse modo, sugere-se medidas de saneamento emergenciais nos rebanhos acometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. F. et al. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, p.13-18, 2013.

BARCELOS, B. et al. Efeito da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina na contagem total e diferencial dos leucócitos no leite de cabras. In: Anuário da produção de iniciação científica discente, vol. XI, n.12, 69-77, 2008.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, p.689-716, 2003.

BEZERRA JUNIOR, R.S. **Influência da artrite encefalite caprina (CAE) nas características físico-química e microbiológica do leite e análise histológica da glândula mamária.** 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

BIRGEL JUNIOR, E.H. et al. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 199-206, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Brasília, D.F., 2000.

BRITO, R.L.L. **Implicações da Artrite Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras.** 2009. 109f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual vale do Acaraú, Sobral.

CONTRERAS, A. et al. Etiología de la infección intramamaria caprina em relación con los programas de control. In: XXVI Jornada Científica de la SEOC. Sevilla, 71-83, 2001.

CORRALES, J.C. et al. Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. En: "Mamitis caprina I". **Ovis**, v.53, p. 33-65, 1997.

CORREA, C.M. et al. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 3, p. 273-278, 2010.

CUNHA, R.G.; NASCIMENTO, M..D. Antibodies occurrence to caprine arthritis-encephalitis virus in goat sera from Rio de Janeiro State (Brazil). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.2, p.72-75, 1995.

MOOJEN, V. Maedi-Visna dos ovinos, p. 138-144. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Méndez, M.D.C.; Lemos R.A.A. **Doenças dos ruminantes e dos equinos**. Vol. 1. Editora Varela, São Paulo, 2001.

LEITNER, G. et al. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. **Veterinary Journal**, v.183, p.328-331, 2010.

McDOUGALL, S. et al. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminat Research**, v.40, 245-254, 2001.

MOREIRA, M.C. et al. Dados sorológicos da artrite encefalite caprina no estado do Rio de Janeiro (BR) e avaliação do uso do índice clínico como ferramenta de diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, n. 2, p.51-53, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL – NMC. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. USA: Nacional Mastitis Council, Inc, 1999. 222p.

- NEVES, P.B. et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.379-384, 2010.
- NORD, K.; ADNOY, T. Effects of infection by caprine arthritis encephalitis virus on milk production of goats. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2391-2397, 1997.
- PAES, P.R.O. et al. Effects of administration of vitamin E on mammary health and milk cell counts of first parturition goats experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.1, p.15-20, 2003.
- PEIXOTO, R.M. et al. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.754-762, 2010.
- ROTA, A.M. et al. Uso de la prueba de califórnia para detección de mamitis en el ganado caprino. **Avances en Alimentacion y Mejora Animal**, v.2, p.67-69, 1994.
- RYAN, D.P. et al. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. **Journal of Dairy Research**, v.60, n.3, p.299-306, 1993.
- SÁNCHEZ, A. et al. Relationship between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cells count in dairy goats. **Veterinary Record**, v. 148, n. 23, p. 711-714, 2001.
- SANTOS, A.R. et al. Contagem de células somáticas e "California Mastitis Test" como método diagnóstico da mamite em caprinos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.3, p.50-55, 2004.
- SMITH, M.C.; CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.193, n.1, p.63-67, 1988.
- TURIN, L. et al. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. **Small Ruminant Research**, v.57, p.73-79, 2005.
- VILLANOVA, M. et al. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras saanen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.235-240, 2008.
- WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v.33, p. 117-121, 1999.
- ZENG, S.S. Comparisons of goat milk standards with cow milk standards of analyses somatic cell count, fat, and protein in goat milk. **Small Ruminant Research**, v.21, p.221-225, 1996.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pôde-se relatar a primeira ocorrência de *Mycoplasma agalactiae* no Estado do Rio de Janeiro e fora da região nordeste brasileira. Tal achado reforça a necessidade de estudos adicionais sobre a presença deste agente em outros rebanhos caprinos localizados na região sudeste brasileira.

Foi observado que o método diagnóstico de eleição para a detecção da CAE é a IDGA, especialmente para o monitoramento inicial do rebanho. A PCR, em especial a "nested"-PCR do sangue, auxilia ao identificar animais que ainda não soroconverteram, evidenciando falso-negativos, apesar do leite ser considerado a principal via de eliminação do CAEV. Desta forma, o emprego combinado de ambas as técnicas permitiria melhor diagnóstico e controle no rebanho, diminuindo o risco de propagação da enfermidade. Também se observou que, ao contrário do que é relatado em alguns estudos, não houve correlação da infecção ocasionada pelo CAEV com indicadores de avaliação da saúde da glândula mamária caprina, tal qual CCS, CTB e isolamento bacteriano. Ainda, que a CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano, devendo ser avaliada com cautela em estudos relacionados à mastite caprina.

Diante do grande número de animais positivos obtidos nesse trabalho, não há dúvidas em afirmar que a CAE constitui uma enfermidade endêmica, já disseminada pelos rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro. Desse modo, sugere-se a adoção emergencial de medidas de saneamento nos rebanhos acometidos, a fim de se reduzir a prevalência da doença.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.S. The meaning of the Agar Gel Immunodiffusion test (AGID) for antibody against Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV). *Dairy Goat Journal*, v. 60, n. 9, p. 633-635, 1982.

ALCÂNTARA, M.D.B. *Soroprevalência da agalaxia contagiosa e vacinação experimental em caprinos*. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

ALMEIDA, J. F. *Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura*. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

ALMEIDA, J.F.; AQUINO, M.H.C; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M.L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.80, n.1, p.13-18, 2013.

AMARAL, D.S.; AMARAL, D.S.; NETO, L.G.M. Tendências de consumo de leite de cabra: enfoque para a melhoria da qualidade. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.6, n.1, p.39-42, 2011.

AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology*, v. 75, p. 1265-1270, 2011.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.3, p.396-400, 2001.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.M.L. *Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue*. Comunicado Técnico Embrapa, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/533316/1/cot72.pdf>>. Acesso em 14 fev. 2014.

ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.R.; SOUZA, G.N. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. *Ciência Rural*, v. 34, n. 5, p. 1497-1500, 2004.

AZEVEDO, E. O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.M.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.DO.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. Contagious Agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 576-581, 2006.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; HOOSEAR, K.V.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of virology methods*, v. 50, p. 101-114, 1994.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.16, n.3, p.848-873, 1997.

BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LANGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, v.34, p.689-716, 2003.

BERTOLINI, D.A.; SANTOS, G.T.; MIRANDA-NETO, M.H. Compilação de dados sobre a epidemiologia e profilaxia da artrite encefalite caprina. *Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 1, n. 1, p. 17-26, 1997.

BIRGEL JUNIOR, E.H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R.M.; LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL, D.B.; RAIMONDO, R.F.S.; BRANDESPIN, F.B.; BIRGEL, E.H. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 74, p. 199-206, 2007.

BORGES, C.H.P. Custos de produção do leite de cabra na região sudeste do Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/gerenciamento/custos-de-producao-do-leite-de-cabra-na-regiao-sudeste-do-brasil-5n.aspx>>. Acesso em 13 fev. 2014.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 26, n. 1, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Brasília, D.F., 2000

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F. Como (re) conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos. Circular Técnica. Juiz de Fora, MG, 2002. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/594822/1/CT70Comoreconhecerecontrolaramastite.pdf>>. Acesso em 13 fev. 2014.

BRITO, R.L.L. Implicações da Artrite Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. 2009. 109f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual vale do Acaraú, Sobral, 2009.

CAMARA, S. A. V. *Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001*. 2002. 79 f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde) - Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande, 2002.

CAMPOS, A. C. *ELISA proteína-G para o diagnóstico de Agalaxia Contagiosa dos ovinos e caprinos*. Recife, 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

CASTRO, R. S. *Lentivírus de Pequenos Ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. 1998. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A.M.G. Isolamento e identificação pela imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 235-240, 1999.

CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 2037-2051, 1996.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.68, p.145-153, 2007.

CORRALES, J.C.; SÁNCHEZ, A.; LUENGO, C.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank Milk somatic cell count in Murciano-Granadina goat herds. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 10, p. 3165-3171, 2004.

CORRALES, J.C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SANCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.68, p.154-166, 2007.

CORREA, C.M. et al. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. 3, p. 273-278, 2010.

COSTA, R.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; PEREIRA, R.A.G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p.307-321, 2009.

DAMASSA, A.J.; WAKENELL, P.S.; BROOKS, D.L. *Mycoplasma* of goats and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.4, p.101-113, 1992.

DAWO, F.; MOHAN, K. Development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to *Mycoplasma crocodyli* infection in crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Veterinary Microbiology*, v.119, n.2-4, p.283-289, 2007.

DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A. HARKISS, G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, v.107, p.49-62, 2005.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; RAMÍREZ, A.S.; POVEDA, J.B. Inactivation of *Mycoplasma* species involved in contagious agalactia. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, v.117, n.1-2, p.1-5, 2004.

DE LA FE, C.; SANCHES, A.; GUTIERREZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, C.; POVEDA, J.B. Effects on goat Milk quality of the presence of *Mycoplasma* spp. in herds without symptoms of contagious agalactiae. *Journal of Dairy Research*, v. 76, n. 1, p. 20-23, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. In: FAOSTAT-FAO Statistics Division 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 13 fev. 2014.

FRANKE, C. R. Uma virose emergente ameaça o rebanho caprino nacional: Artrite-Encefalite Caprina (CAE). *Revista Bahia Agrícola*, v. 2, n. 3, nov. 1998.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BON DURANT, R. Presence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology*, v. 57, p. 931-940, 2003.

GOMES, M.J.P.; FEITOSA, M.H.; KHRAL, M.; FERNADES, R.E.; NASCIMENTO, E.R.; PORTUGAL, M.A.S.L. Micoplasmose caprina: pneumonia. Primeiro relato no Brasil de *Mycoplasma arginini*. *Higiene Alimentar*, v.8, p.18-20, 1994.

GOMES, V. LIBERA, A.M.M.P.D.; MADUREIRA, K.M.; ARAÚJO, W.P. Influência do estágio de lactação na secreção láctea de cabras (*Capra hircus*) Saanen. *Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.5, p.339-342, 2004.

GOMES, V.; MADUREIRA, K.M.; BARCELOS, B.; SILVA, C.P.C; BLAGITZ, M.G.; LIBERA, A.M.M.P.D. Composição celular e bromatológica do leite de cabras infectadas pelo Vírus da Artrite Encefalite Caprina (VAEC). *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 4, p. 1053-1055, 2011.

GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. Qualidade higiênica do leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, p. 743-748, 2008.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, p. 21-25, 2001.

GREGORY, L.; CARDOSO, M.V.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, R.M.; PACHECO, W.A.; BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, n.2, p.179-181, 2003.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S.; RODRIGUES, J.N.M; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W; DURIGON, E.L. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabras pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR. *ARS Veterinaria*, v. 25, n. 3, p. 142-146, 2009.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S.; FATINI, L.C.; GAETA, N.C.; RODRIGUES, J.N.M; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W; DURIGON, E.L. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em pulmão, glândula mamária, cérebro e líquido sinovial de cabras naturalmente infectadas pela técnica de nested-PCR. *Medicina Veterinária*, v. 5, n. 1, p. 7-11, 2011.

HAELEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, v.51, p.155-163, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf>. Acesso em 10 fev. 2014.

KNOWLES JÚNIOR, D.P.; EVERMANN, J.F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H.M.; CHEEVERS, W.P. Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to Caprine Arthritis Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NADER FILHO, A.; VIANI, M.C.E. Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina em criatórios do Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, n.4, p.463-474, 1995.

MADANAT, A.; ZENDULKOVA, D.; POSPÍSIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Veterinaria Brno*, v.71, p.37-44, 2002.

MADUREIRA, K.M.; GOMES, V.; CASTRO, R.S.; KITAMURA, S.S.; ARAÚJO, W.P. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 311-316, 2010.

MAGALHÃES, A.C.M. Obtenção higiênica e parâmetros de qualidade do leite de cabra. Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.cpd.ufv.br/dzo/caprinos/artigos_tec/hig_quali.pdf>. Acesso em 16 fev. 2014.

MARINHO, M.L. *Ação terapêutica do bioterápico de Mycoplasma agalactiae em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos*. 2008. 118p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MCGUIRE, T.C.; O'ROURKE, K.I.; KNOWLES, D.P.; CHEEVERS, W.A. Caprine Arthritis Encephalitis lentivirus transmission and disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 160, p. 61-75, 1990.

MONTINGELLI, N.M.M. *Pré-disposição do leite de cabra para a fabricação de queijos*. Lavras, 2005. 50p. Monografia (Pós-graduação *Latu Sensu* em Controle de Qualidade de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2005.

MOOJEN, V. Maedi-Visna dos ovinos, p. 138-144. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Méndez, M.D.C.; Lemos R.A.A. *Doenças dos ruminantes e dos equinos*. Vol. 1. Editora Varela, São Paulo, 2001.

MOREIRA, M.C. et al. Dados sorológicos da artrite encefalite caprina no estado do Rio de Janeiro (BR) e avaliação do uso do índice clínico como ferramenta de diagnóstico. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 29, n. 2, p.51-53, 2007.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.2, n.3, p.57-61, 2008.

MULLER, E.E.; NASCIMENTO, E.R.; METTIFOGO, E.; REIS, A.C.F.; FREITAS, J.C.; NASCIMENTO, M.G.F. Isolamento de *Mycoplasma arginini* e *Actinomyces pyogenes* de ovino com pleuropneumonia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.3, p.118-119, 1998.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREUND, E.A.; ANDERSEN, H. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brasil. *British Veterinary Journal*, v.142, n.246, 1986.

NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O.; AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, M.G.F. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: XVI Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM). Viena, p.45-46, 2002.

NASCIMENTO, M.G.F.; NASCIMENTO, E.R. Isolamento de *Mycoplasma arginini* em caprinos. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 18, 1982, Camboriú, SC. *Anais...*Santa Catarina: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, Sociedade dos Médicos Veterinários de Santa Catarina, 1982, p.74.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL – NMC. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. USA: Nacional Mastitis Council, Inc, 1999. 222p.

NOCARD, E.; ROUX, E. Le microbe de lá péripneumoniae. *Annual Institute Pasteur*, v.12, p.240-262, 1898.

NORD, K.; ADNOY, T. Effects of infection by caprine arthritis encephalitis virus on milk production of goats. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 10, p. 2391-2397, 1997.

NUNES, G.R.; BLAGITZ, M.G.; FREITAS, C.B.; SOUZA, F.N.; RICCIARDI, M.; STRICAGNOLO, C.R.; SANCHES, B.G.S.; AZEVEDO, M.R.; SUCUPITA, M.C.A.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.3, p.271-278, 2008.

OLIVER, R.E.; MCNIVEN, R.A.; JULIAN, A.F.; POOLE, W.S. Experimental infection of sheep and goats with caprine arthritis-encephalitis virus. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 30, p. 158-159, 1982.

PAES, P.R.O. et al. Effects of administration of vitamin E on mammary health and milk cell counts of first parturition goats experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n.1, p.15-20, 2003.

PARK, Y.W.; HUMPHREY, R.D. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat and protein. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.32-37, 1986.

PEIXOTO, R.M. et al. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.754-762, 2010.

PENHA, A.M.; D' APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.13, p.299-301, 1942.

PETURSSON, G.; ANDRESDOTTIR, V.; ANDRESSON, O.S.; TORSTEINSDOTTIR, S. Lentivirus disease of sheep and goat: Maedi-Visna an Caprine Arthritis encephalitis. p. 107-129. In: Speedy A.W. Progress in Sheep and Goat Research. Keldur, 1992.

QUADROS, D.G. Leite de cabra: produção e qualidade. *Pubvet*, v.2, n.1, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=363>. Acesso em 18 fev. 2014.

RAVAZZOLO, A.P.; NENCI, C.; VOGT, H.R; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF, G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, v. 350, p. 116-127, 2006.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An Update. *Small Ruminant Research*, v.79, p.57-72, 2008.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF, J.R.W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; NASCIMENTO, M.G.F; LIGNON, G.B. Ocorrência de micoplasmas em caprinos através das técnicas de

Imunofluorescência Indireta e Inibição de crescimento. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n.1, p.26-28, 1995.

RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DeROCK, E.; PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infectious in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.

RYAN, D.P.; GREENWOOD, P.L.; NICHOLLS, I.J. Effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, v. 60, p. 299-306, 1993.

SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C; MARCO, J.C. Relationship between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cells count in dairy goats. *Veterinary Record*, v. 148, n. 23, p. 711-714, 2001.

SANTOS, L.M.M. *Contagem de células somáticas em leite de cabra versus artrite encefalite caprina por IDGA e PCR*. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

SANTOS, L.M.M.; PEREIRA, C.S.; MACHADO, L.S.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, E.R. Queda na produção de leite de cabra por surto de micoplasmose. *Enciclopédia Biosfera*, v.8, n.15, p.1510-1515, 2012.

SANTOS, S. B. *Imunoperoxidase e métodos moleculares na detecção de Mycoplasma spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) em conduto auditivo de bovinos e em Raillietia spp. (Gamasida: Raillietidae)*. Seropédica, 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SAMPELAYO, M.R.S; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.H.; BOZA, J. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v.68, p.42-63, 2007.

SIGURDSON, B. Rida, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *British Veterinary Journal*, v. 110, p. 341-354, 1954.

SILVA, J.B.A.; LIMA, P.M. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Veterinaria Brasileira*, v. 1, n. 4, p. 111-117, 2007.

TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento e identificação do vírus da artrite encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 2, p. 124-131, 2006.

TORRES, J.A.; CAMPOS, G.S.; FREITAS, M.M.; BRANDÃO, C.F.L.; SARDI, S.I. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA). *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 8, n. 2, p. 107-114, 2009.

VILEI, E. M.; KORCZAK, B. M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. *Veterinary Research*, v. 37, p. 779-790, 2006.

ZINK, M.C.; JOHNSON, L.K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v. 32, n. 2, p. 139-154, 1994.