

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE CABRA VERSUS
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA POR IDGA E PCR**

**Niterói, RJ
2010**

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE CABRA VERSUS
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA POR IDGA E PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADOR: Dr ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO

CO-ORIENTADOR: Dra JULIANA FERREIRA DE ALMEIDA

Niterói, RJ
2010

LÍDIA MARIA MARQUES DOS SANTOS

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE DE CABRA VERSUS
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA POR IDGA E PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 04 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
Orientador- UFF

Dra. Juliana Ferreira de Almeida
UFF

Dr. Roberto Soares de Castro
UFRPE

Niterói, RJ
2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, guia espiritual e mentor.

À minha família, pai, mãe e irmãos, pelo apoio incondicional e por sempre terem confiado nas minhas escolhas.

Ao meu namorado, Rodrigo, pelo companheirismo e carinho dedicados a mim.

Ao meu ilustre orientador Dr Elmiro Rosendo do Nascimento, por ter me aceitado de braços abertos como sua orientada. Muito obrigada!

À querida co-orientadora Dra Juliana Ferreira de Almeida, pela imensurável ajuda em todas as fases de confecção deste trabalho.

Às médicas veterinárias Karine de Castro Meireles Vieira e Eunice Maria Rodrigues Alberto, pela colaboração na obtenção das amostras clínicas e contato com os produtores, indispensáveis para a realização deste estudo.

À médica veterinária Raquel Lisboa, pelo fornecimento do protocolo de extração de DNA, de importância vital para a realização das análises.

À médica veterinária e pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Dra Alice Andrioli Pinheiro, pelo envio do protocolo detalhado da “Nested” PCR.

À professora Dra Virgínia Léo de Almeida Pereira, pela disponibilidade e apoio na confecção deste estudo.

Ao professor Dr. Roberto Soares de Castro, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo fornecimento dos kits de diagnóstico da CAE.

Aos produtores de leite de cabra, por terem permitido a realização das coletas das amostras clínicas de seus animais e pela confiança no trabalho da equipe.

À toda equipe dos Laboratórios de Epidemiologia Molecular, principalmente aos colegas Leandro dos Santos Machado e Davi Almeida, pelo apoio incondicional na realização deste estudo.

Ao senhor Dráusio de Paiva Ferreira, secretário do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pelo auxílio em diversos momentos.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, atualmente representada pela Dra Mônica Freitas de Queiroz, pelo empenho e dedicação.

A todos os ilustríssimos mestres que auxiliaram para a minha formação acadêmica.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente com o presente estudo.

Ao CNPq e à FAPERJ, pelo suporte financeiro.

RESUMO

O leite de cabra fornece calorias e aminoácidos essenciais em proporções iguais ou superiores às recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A mastite pode comprometer a quantidade e a qualidade do leite produzido, sendo considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira. Várias técnicas para detectar a inflamação da glândula mamária em cabras têm sido estudadas, sendo as mais aceitas o “California Mastitis Test” (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS). A mastite pode ocorrer em animais acometidos por Artrite Encefalite Caprina (CAE). A CAE é uma doença de caráter crônico, que pode acometer caprinos de várias raças, ambos os sexos e de todas as idades. O diagnóstico pode ser realizado por testes sorológicos, sendo o mais empregado a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e com os avanços nas técnicas de biologia molecular, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também tem sido amplamente utilizada. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do leite de cabra pela CCS e análise físico-química, e relacionar ao diagnóstico da CAE por IDGA e PCR. Foram coletadas amostras de leite e de sangue de 108 cabras provenientes de dois rebanhos localizados no município de Leopoldina, MG. Dos animais estudados, 22 do rebanho A (37,29%) e cinco (14,29%) do rebanho B apresentaram CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite. De acordo com as análises estatísticas, obteve-se diferença significativa para a CCS entre os dois rebanhos ($p < 0,05$). A positividade para CAE pela IDGA foi de 14,8% (16/108) e pela PCR, 35,18% (38/108). Todos os animais que apresentaram resultado positivo eram do rebanho A. Pela análise dos valores médios dos parâmetros físico-químicos e de CCS houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente em relação à proteína. Pelo teste de Kappa, a concordância entre IDGA e PCR foi de 25%, considerada fraca, o que indica que os dois testes não estão relacionados ($p > 0,05$). Ao se relacionar a positividade para CAE por IDGA e/ou PCR com os resultados físico-químicos não houve diferença significativa. O risco (*odds ratio*) de animais positivos para o CAE apresentarem CCS elevada foi 6,7 maior quando comparado às cabras não infectadas.

Palavras-chave: Leite de cabra, CCS, CAE, IDGA, PCR.

ABSTRACT

Goat milk provides calories and essential amino acids in proportions equal to or higher than those recommended by the World Health Organization (WHO). Mastitis can compromise the quantity and quality of the produced milk, and is considered the disease which causes the greatest economic losses to dairy production. Several techniques to detect inflammation of the mammary gland in goats have been studied and the most accepted are the California Mastitis Test (CMT) and Somatic Cell Count (SCC). Mastitis can occur in animals affected by caprine arthritis encephalitis (CAE). CAE is a chronic disease that can affect animals of various breeds, both sexes and all ages. The diagnosis can be made by serological tests and the most utilized of them is the Immunodiffusion in Agarose Gel (AGID). Actually, with the advances in molecular biology techniques, the Polymerase Chain Reaction (PCR) has also been widely used. The aim of this study was to evaluate the quality of goat milk by SCC and physical-chemical analysis and relate to the diagnosis of CAE by AGID and PCR. Samples were collected from milk and blood of 108 goats from two herds located in the city of Leopoldina, MG. Of the animals studied, 22 of the herd A (37.29%) and five (14.29%) of the B showed SCC above 1,000,000 cells / mL of milk. According to statistical analysis, was obtained a significant difference in SCC between the two herds ($p < 0.05$). Positivity for the CAE by AGID was 14.8% (16/108) and PCR, 35.18% (38/108). All animals tested positive were from herd A. The analysis of the average values of physical-chemical parameters and SCC showed significant difference ($p < 0.05$) only in relation to the protein. Regarding the Kappa test, the correlation between AGID and PCR was 25%, considered low, indicating that the two tests are not related ($p > 0.05$). When dealing with positivity for CAE by AGID and/or PCR results with the physical-chemical there wasn't significant difference. The risk (*odds ratio*) of animals positive for CAE submit elevated SCC was 6.7 higher when compared to non-infected goats.

Key-words: Goat milk, SCC, CAE, AGID, PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Cabras puras ou mestiças da raça Saanen do rebanho A, Leopoldina, MG, 2009, p. 30
- Figura 2 Cabras mestiças das raças Parda Alpina e Saanen do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009, p. 31
- Figura 3 Ordenha manual realizada no rebanho A, Leopoldina, MG, 2009, p. 31
- Figura 4 Ordenha manual em cabras do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009, p. 32
- Figura 5 Realização de “pos-dipping” após ordenha manual em cabras do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009, p. 32
- Figura 6 Coleta de amostra de leite de cabra do rebanho A, Leopoldina, MG, 2009, p. 34
- Figura 7 Frascos com pastilha do conservante bronopol[®] para CCS, p. 34
- Figura 8 Frascos contendo amostra de leite para CCS. A. Etiqueta com identificação por cabra e frasco coletor. B. Frascos já etiquetados, p. 35
- Figura 9 Equipamentos eletrônicos “Somacount 300” e “Bentley 2000” da Bentley Instruments Incorporated[®], Minnesota, EUA, utilizados para a CCS e determinação de componentes físico-químicos em amostras de leite, p. 35
- Figura 10 Esquema de lâmina utilizada no diagnóstico da CAE pela técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), na qual: A - poço para colocação do antígeno; C - poço para disposição do soro controle; 1 a 9 - poços para os soros a serem testados, p. 37

Figura 11 Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV. PCR de amostras de sangue, sendo L: marcador DNA Ladder; 1 a 8: amostras positivas com bandas de 185 pb; 9 e 10: amostras negativas; C+: controle positivo; C-: controle negativo, p. 44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Efetivo do rebanho caprino nacional por cabeça durante os anos de 2007 e 2008, p. 16
Tabela 2	Composição do leite caprino, ovino, bovino e humano, p. 18
Quadro 1	Reação em Cadeia da Polimerase e “Nested” PCR para a detecção do lentivírus caprino (CAEV), p. 38
Quadro 2	Programação da PCR e “Nested” PCR para o CAEV, p. 39
Quadro 3	Estimativa da perda de leite por lactação em vacas segundo as classes de CCS, p. 40
Tabela 3	Distribuição do número de animais de acordo com as classes de CCS nos rebanhos A e B, p. 41
Tabela 4	Valores médios dos componentes físico-químicos do leite de cabra e de CCS dos rebanhos analisados, p. 42
Tabela 5	Concordância entre IDGA e PCR para CAE em cabras do rebanho A por teste de Kappa ($p < 0,05$), p. 43
Tabela 6	Validade do IDGA para CAE utilizando PCR como padrão ($p < 0,05$), p. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
CAE	Caprine Arthritis Encephalitis
CAEV	Caprine Arthritis Encephalitis Virus
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	California Mastitis Test
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
FAO	Food and Agricultural Organization
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
LVPR	Lentivírus dos Pequenos Ruminantes
OIE	World Organization for Animal Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

RESUMO, p.5

ABSTRACT, p.6

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.7

LISTA DE QUADROS E TABELAS, p.9

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, p.10

1 INTRODUÇÃO, p.13

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.15

2.1 PRODUÇÃO DE CAPRINOS LEITEIROS NO BRASIL, p.15

2.2 CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE DE CABRA, p.17

2.3 PARÂMETROS RELATIVOS À QUALIDADE DO LEITE DE CABRA, p.19

2.4 IMPLICAÇÕES DA MASTITE EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS, p.22

2.4.1 Considerações sobre a mastite caprina, p.22

2.4.2 Prevenção e controle da mastite em cabras, p.23

2.5 VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV), p.25

2.6 DIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, p.27

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.29

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES LABORATORIAIS, p.29

3.2 MODALIDADE DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.29

3.3 CARACTERÍSTICAS DOS REBANHOS ESTUDADOS, p.30

3.4 COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS, p.33

3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA, p.33

3.6 DIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, p.36

3.6.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), p.36

3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), p.37

4 RESULTADOS, p.40

4.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA, p.40

4.2 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE, p.42

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), p.43

5 DISCUSSÃO, p.45

6 CONCLUSÕES, p.49

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.50

8 ANEXOS, p.57

8.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE, p.57

8.2 CÁLCULO DOS REAGENTES UTILIZADOS NA PCR E “NESTED” PCR, p.59

1 INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes possuem um papel importante na nutrição e na renda da população mundial. Há estimativas de que mais de 460 milhões de caprinos em todo o mundo produzam anualmente cerca de 4,5 milhões de toneladas de leite e 1,2 milhão de toneladas de carne (MBILU, 2007).

No setor agrícola é notória a evolução da caprinocultura leiteira em níveis mundiais. No final da década de 80 houve um aumento considerável da produção mundial de leite de cabra. A maior produção do leite dessa espécie no continente americano é obtida no Brasil, cujo montante anual de leite produzido foi de 1,07% (135 mil toneladas) do total mundial em 2005 (FAO, 2007; GONÇALVES et al., 2008).

Dentre os alimentos de origem animal utilizados na alimentação humana o leite de cabra ocupa lugar de destaque, uma vez que fornece calorias e aminoácidos essenciais em proporções iguais ou superiores às recomendadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS (FURTADO, 1981; BARROS; LEITÃO; 1992; GOMES et al., 2004).

A mastite é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Consiste na inflamação da glândula mamária que ocorre, na maioria das vezes, como resposta a uma infecção causada por microrganismos. Caracteriza-se por mudanças físicas, químicas e bacteriológicas no leite e por alterações patológicas no úbere. O reconhecimento

precoce unido ao rápido tratamento são medidas importantes para limitar os danos teciduais e as perdas ocasionadas pela doença (RIBEIRO et al., 2003; SHEARER; HARRIS, 2003).

Nos rebanhos caprinos o aparecimento das mastites é favorecido por fatores que intervêm na transmissão horizontal dos patógenos. Isto se deve às particularidades de defesa da glândula mamária caprina, que proporciona resistência às infecções ambientais devido a maior quantidade fisiológica de células somáticas no leite desses animais, assim como um percentual de polimorfonucleares neutrófilos superior ao da vaca (MOTA, 2008).

Várias técnicas para detectar a inflamação da glândula mamária em cabras têm sido estudadas, sendo as mais aceitas o “California Mastitis Test” (CMT), pela praticidade a campo, e a Contagem de Células Somáticas (CCS), em razão de sua sensibilidade e especificidade (PAES et al., 2003).

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma patologia ocasionada pelo “caprine arthritis-encephalitis virus” (CAEV), pertencente ao gênero *Lentivirus* da família Retroviridae, subfamília Lentivirinae. Constitui doença de caráter crônico, que pode acometer caprinos de várias raças, ambos os sexos e de todas as idades. Os animais podem apresentar manifestações clínicas como: artrite, encefalite, mastite, pneumonia e emagrecimento crônico. Os prejuízos econômicos estão relacionados à baixa produção leiteira e ao descarte de animais (FRANKE, 1998).

Para o diagnóstico da CAE a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda, além do isolamento viral (técnica demorada e nem sempre bem sucedida), testes sorológicos, sendo o mais empregado a Imunodifusão em Gel de Agarose – IDGA (OIE, 2008). Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, sequenciamento e maiores conhecimentos sobre o genoma viral, pode-se lançar mão de recursos modernos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), instrumento potencial para identificação de cepas isoladas e no diagnóstico da doença a partir de espécimes clínicos (CLEMENTS; PAYNE, 1994; LEROUX et al., 1997).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do leite de cabra pela CCS e análise físico-química, e relacionar ao diagnóstico da CAE por IDGA e PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE CAPRINOS LEITEIROS NO BRASIL

Os caprinos foram introduzidos nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus, adaptando-se melhor nas áreas tropicais onde estão concentrados atualmente. Esses animais foram trazidos para o Brasil pelos portugueses ocupando primeiramente a faixa litorânea antes de se mudar para a caatinga, onde adquiriram alto nível de rusticidade e resistência às doenças e intempéries, escassez hídrica e alimentar (SILVEIRA, 2008).

A adaptação dos caprinos à ampla variação de condições climáticas e de manejo faz com que eles apresentem maior eficiência produtiva em relação a outros ruminantes domésticos, como bovino, ovino ou bubalino, estando presente em regiões com condições precárias para o desenvolvimento de outras espécies (QUADROS, 2008).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2008), há atualmente no Brasil cerca de 9,35 milhões de caprinos, sendo a região Nordeste detentora do maior rebanho caprino nacional, com aproximadamente 8,5 milhões de cabeças (Tabela 1).

A cabra é a terceira espécie produtora de leite em volume de produção mundial. De acordo com a “Food and Agricultural Organization” (FAO, 2006), em 2005 a produção mundial de leite de cabra atingiu 12,5 milhões de toneladas, mas menos de 5% deste total foi comercializado. A maior parte do leite de cabra

produzido no mundo é utilizada no consumo doméstico das famílias, vendida para a vizinhança ou usada na alimentação de crianças (DUBEUF, 2005). No Brasil, a produção de leite de cabra foi de 135.000 toneladas em 2005, o que representa 1,1% da produção mundial (FAO, 2006).

No Brasil existem duas regiões bem distintas quanto à exploração da atividade leiteira caprina. A região Nordeste, recentemente motivada por ações governamentais, apresenta ainda, de forma geral, baixos níveis tecnológicos e baixa produtividade. Por outro lado, na região Centro-Sul predomina o sistema intensivo, destinando-se à produção de leite, queijos finos e iogurtes. Quanto ao consumo, observa-se que a maior parte do leite de cabra (94%) é consumida sob a forma de leite fluido, 3% como leite em pó e 3% como derivados (FERNANDES, 2007).

O mercado de leite de cabra no Brasil ainda está em desenvolvimento, mas tem apresentado um crescimento muito grande nos últimos anos, especialmente nas grandes cidades. Esse produto vem conquistando crescente mercado, tanto na forma de leite pasteurizado, pasteurizado congelado, como na forma de leite em pó e mais recentemente, desde 1998, em embalagens tipo longa vida UHT, esterilizado e aromatizado (MARTINS et al., 2007; CORDEIRO; CORDEIRO; 2009).

Tabela 1 Efetivo do rebanho caprino nacional por cabeça durante os anos de 2007 e 2008.

Brasil e Região Geográfica	2007	2008	Variação (%)
Brasil	9.450.312	9.355.220	- 1,01
Norte	167.326	176.443	5,45
Nordeste	8.633.722	8.521.388	- 1,30
Sudeste	253.294	226.059	- 10,75
Sul	279.924	317.922	13,57
Centro-oeste	116.046	113.408	-2,27

Fonte: IBGE, 2008

2.2 CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE DE CABRA

O leite de cabra é um alimento com alto valor nutritivo e contem os elementos necessários à nutrição humana, como açúcar (lactose), proteínas, gorduras, vitaminas, ferro, cálcio, fósforo e outros minerais (Tabela 2). Sua digestibilidade é facilitada em virtude do tamanho reduzido e fácil dispersão dos seus glóbulos de gordura e pela sua proteína de coagulação que forma uma coalhada fina, macia e com perfeita digestão em um curto espaço de tempo (COSTA, 1998). Ocupa lugar de destaque dentre os alimentos de origem animal utilizados na alimentação humana, uma vez que fornece também calorias e aminoácidos essenciais em proporções iguais ou superiores aos recomendados pela OMS (GOMES et al., 2004).

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).

De acordo com Haenlein (2004) o leite de cabra apresenta propriedades bioquímicas que favorecem o seu valor nutricional, sendo recomendado para crianças, particularmente aquelas intolerantes ao leite de vaca, pessoas com doenças gastrintestinais, como suplemento para pessoas idosas e mal nutridas ou mesmo pessoas que fazem tratamento quimioterápico, por diminuir a queda dos cabelos. O consumo diário de 1L pode suprir até um terço das necessidades alimentares diárias de um adulto.

As características nutritivas do leite de cabra estimularam o aumento da produtividade brasileira, principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro. Tal incremento produtivo aponta para a necessidade de pesquisas que avaliem a constituição deste alimento, assim como possíveis alterações fisiológicas envolvidas (GOMES et al., 2004).

O leite caprino é também naturalmente rico nos ácidos graxos voláteis capríco, 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 e dissolver as placas deste (HAENLEIN, 2004).

Constitui um alimento importante para idosos em virtude do seu alto teor de cálcio, baixos teores de açúcar e colesterol, por ser de melhor digestão e com isso bem aproveitado pelo organismo, além de complementar a alimentação. É recomendado para crianças sensíveis a algumas proteínas presentes no leite de vaca, como a caseína e a lactoalbumina, que podem provocar asma brônquica, eczemas na pele, dores abdominais e diarreias. O leite de cabra também é indicado para pessoas alérgicas à proteína do leite de vaca ou que estejam com problemas nutricionais ou gastrointestinais (SILVEIRA, 2008).

Tabela 2 Composição do leite caprino, ovino, bovino e humano.

Componentes	Caprino	Ovino	Bovino	Humano
Gordura (%)	3,8	7,6	3,7	4,0
Sólidos não gordurosos (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Cinzas totais (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Ca (%)	0,19	0,16	0,18	0,04
P (%)	0,27	0,14	0,23	0,06
Cl (%)	0,15	0,27	0,10	0,06
Vitamina A (UI/g de gordura)	39	25	21	32
Vitamina B1 (mg/100mL)	68	7	45	17
Vitamina B12 (mg/100mL)	210	36	159	26
Vitamina C (mg/100mL)	20	43	2	3,6
Vitamina D (UI/g de gordura)	0,7	ND	0,7	0,27

ND: não definido

Adaptado de Ribeiro (1997); Park et al. (2007); Almeida (2009).

2.3 PARÂMETROS RELATIVOS À QUALIDADE DO LEITE DE CABRA

A qualidade do leite de cabra é definida por seus parâmetros físicos, 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 a sua comercialização são fundamentais para garantir qualidade e segurança alimentar ao consumidor (MAGALHÃES, 2005).

A implantação de práticas de pagamento do leite, considerando-se a qualidade da matéria prima por indústrias de laticínios, tem sido baseada em parâmetros indicativos de rendimento, como o extrato seco total, ou naqueles indicativos da saúde do rebanho, como a contagem de células somáticas (CCS). A adoção de indicadores de qualidade do leite de cabra visa garantir a qualidade e identidade do produto destinado ao mercado consumidor, além de possibilitar a identificação de possíveis falhas nos processos de produção, armazenamento e transporte do leite (ibid.).

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 limites, tais como:

- Contagem padrão em placas (contagem total): menor/igual a 500.000 UFC/mL;
- Proteína bruta: 2,8%;
- Lactose: 4,3%;
- Sólidos não gordurosos: 8,2%;
- Cinzas: 0,7%;
- Acidez titulável (em % ácido láctico): 0,13 a 0,18;
- Densidade: 1024 a 1028;
- Índice crioscópico: -0,585 a -0,550 °H;
- Contagem de células somáticas (CCS): limite não definido.

Entende-se por células somáticas aquelas encontradas no leite e que se originam do sangue e da glândula mamária dos animais. A maioria destas células passa do sangue para a cisterna da glândula mamária em resposta a um estímulo, e uma pequena proporção desprende-se da glândula à medida que envelhecem. Essas últimas são conhecidas como células epiteliais. As células que se originam do

sangue, células brancas ou leucócitos, possuem a capacidade de defender o animal de agressões externas, causadas por microrganismos, traumas e substâncias químicas (SOUZA et al., 2007).

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 (mL) de leite. A taxa de mastite dos rebanhos pode ser estimada com base na CCS, de acordo com estudos realizados em vários países. A interpretação dos resultados é realizada considerando-se o possível número de animais infectados e os prejuízos causados pela perda na produção (BRITO et al., 2009).

Há várias maneiras de se estimar o número de células somáticas ou de efetivamente contá-las. O CMT é um método prático, barato, realizado a campo e fornece resultados imediatos. Este método utiliza um detergente que ao reagir com o material genético das células somáticas forma um gel que tem sua consistência graduada em escores que variam de 0 a 3, e deve ser realizado antes da ordenha, logo após o descarte dos primeiros jatos de leite. Sua desvantagem é estimar o conteúdo de células de forma subjetiva, o que exige do operador discernimento na leitura e interpretação dos resultados. Outras maneiras de se contar efetivamente as células somáticas dependem do envio de amostras de leite para laboratórios especializados. A CCS pode ser realizada em equipamentos automatizados, que possibilitam o exame de grande número de amostras e a redução do custo da análise. Outro método de contagem é obtido pelo exame microscópico de lâminas coradas, mas é laborioso, caro, e não permite automação (ibid).

A CCS é utilizada como indicador de qualidade do leite tanto para vacas como cabras. Normalmente a CCS no leite de cabras não infectadas é maior que no leite de vacas nas mesmas condições. Em média, a CCS no leite de vacas livres de infecções intramamárias varia de 40.000 a 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 o leite é secretado pela glândula mamária, ou seja, secreção láctea do tipo apócrina (SOUZA et al., 2007).

Segundo Contreras et al. (1998), a cabra se diferencia dos demais ruminantes domésticos em virtude de seu particular tipo de secreção láctea, predominantemente apócrina, além do fato de na espécie ocorrer uma grande variação na contagem de células somáticas relacionada com grau de infecção, idade, volume de leite produzido, período de lactação, entre outros fatores. Na espécie caprina o principal risco de infecção é determinado pelos microrganismos que colonizam o óstio do teto, assim como pelos fatores que favorecem a penetração destes através do canal do teto. Diante desta situação, o momento da ordenha representa um ponto crítico para o controle das mastites em caprinos e ovinos, assim como fatores individuais e ambientais que predispõem à instalação da infecção intramamária (MOTA, 2008).

O aumento no comércio internacional de produtos lácteos tem levado muitos países, especialmente da União Européia, a desenvolverem padrões rígidos para CCS. A União Européia impôs um limite de 400.000 células/mL para o leite bovino, enquanto que os requerimentos para o Canadá e Estados Unidos são 500.000/mL e 750.000/mL, respectivamente. O limite para a CCS é também motivo de grande preocupação para produtores de cabras e processadores de leite. Nos últimos quinze anos a CCS tem sido exaustivamente estudada em caprinos, além de sua relação com a qualidade do leite e saúde do úbere, porém poucos estudos são realizados para avaliar a CCS do leite total dos rebanhos. No momento, o valor de 1.000.000 células/mL é o limite regulamentado para rebanhos tipo A nos Estados Unidos da América (EUA). Esforços tem sido realizados para reduzir o atual padrão da CCS do leite de cabra de 1.000.000 células/mL para 750.000 células/mL (SOUZA et al., 2007).

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

2.4 IMPLICAÇÕES DA MASTITE EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS

2.4.1 Considerações sobre a mastite caprina

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária. Sua etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, destacando-se as de origem bacteriana. Os patógenos causadores de mastite têm sido classificados em dois grupos diferentes: contagiosos e ambientais. Os chamados contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, com multiplicação na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele, e são transmitidos de uma fêmea infectada para uma fêmea sadia, principalmente durante a ordenha. Os patógenos ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e a infecção pode ocorrer no período entre ou durante as ordenhas (COSTA, 1998; FREITAS et al., 2005).

A mastite é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como clínica ou subclínica (RIBEIRO et al., 2003).

A mastite clínica apresenta sinais evidentes como edema, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além da presença de grumos, pus ou qualquer alteração das características físicas do leite (FONSECA; SANTOS, 2000). O diagnóstico é realizado pelo uso da caneca telada, com a visualização de alterações macroscópicas do leite (RIBEIRO et al., 2003).

Na forma subclínica não ocorrem alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite, portanto não há sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR et al., 1994). A mastite subclínica é aquela que apresenta resultado positivo ao CMT ou outros testes indicativos, sendo confirmada pelo crescimento microbiano. Ela pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite (RIBEIRO et al., 2003).

Em pequenos ruminantes, principalmente cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grande problema por aumentar os custos da produção e pelos riscos à saúde pública. Santos (2001), em revisão sobre o impacto econômico

da ocorrência de mastite, reuniu quatro fatores principais responsáveis pelos prejuízos: perdas de produção de leite devido à mastite subclínica, custos dos casos clínicos, custos de descarte e morte prematura, além de prejuízos da indústria por redução na qualidade e no rendimento industrial de derivados.

A presença de mastite clínica ou subclínica implica na aplicação de multas ou penalidades ao preço do leite em função da redução de sua qualidade. As características bacteriológicas do produto serão determinadas pela higienização dos equipamentos e utensílios de ordenha e de transporte e pela manutenção em condições de refrigeração. Os riscos para o consumidor não só ocorrem devido à presença de patógenos no leite, que serão destruídos quando são realizados tratamentos térmicos adequados, mas também pela presença de toxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas, que podem ser termoestáveis e persistirem nos produtos lácteos elaborados com leite de animais infectados, mesmo após a pasteurização ou esterilização (CONTRERAS et al., 2001).

2.4.2 Prevenção e controle da mastite em cabras

Para o controle da mastite caprina, é importante que exista um programa voltado para o diagnóstico e monitoramento constante da criação (CHAPAVAL; PIEKARSKI, 2000).

Segundo Chapaval (2007), das medidas que compõem um programa básico de controle de mastite merecem destaque: a identificação e o tratamento de todas as cabras no período seco; a identificação e o tratamento imediato dos casos clínicos; a manutenção e o funcionamento adequado do sistema de ordenha; o correto manejo da ordenha com ênfase na desinfecção dos tetos após a ordenha; a separação e o descarte de cabras com mastite crônica; e a correta higienização da área de permanência dos animais.

O manejo da ordenha interfere na ocorrência de mastite à medida que evita oportunidades de colonização dos tetos por parte dos microrganismos e diminui a contaminação já existente na superfície dos tetos. De acordo com Chapaval (2007), uma rotina de ordenha deve ser baseada nos seguintes pontos:

- Retirada dos primeiros jatos de leite e teste da caneca de fundo preto;
- Lavagem dos tetos com água corrente (se necessário);
- Imersão dos tetos em solução desinfetante (“pre dipping”);

- Secagem dos tetos com papel toalha descartável;
- Colocação das teteiras e ajuste das mesmas quando necessário;
- Retirada das teteiras depois de cessado o fluxo de leite;
- Imersão dos tetos em solução sanitizante glicerinada (“pos dipping”).

Os animais conduzidos à sala de ordenha devem ser organizados de modo que as fêmeas sadias e, principalmente as cabras primíparas sejam ordenhadas inicialmente seguidas das fêmeas multíparas, fêmeas sadias que já tiveram mastite, e por último, as fêmeas doentes, a fim de se evitar contaminação cruzada (CHAPPAVAL, 2006).

Para o controle das infecções intramamárias deve ser realizada revisão constante dos equipamentos de ordenha, uma vez que teteiras sem manutenção periódica podem ocasionar um refluxo que atua como fenômeno favorecedor de penetração de microrganismos nos tetos, além da possibilidade de contaminação bacteriana provocada pela má conservação dos manguitos (MOTA, 2008).

A higiene dos animais é um ponto importante a ser avaliado e é realizada com a escovação das cabras antes da chegada à sala de ordenha, a fim de evitar a queda de pelos e poeira sobre o leite ordenhado. O uso da água para lavagem dos tetos no momento da chegada dos animais à sala de ordenha é outro ponto que merece destaque. Se os animais chegarem com os tetos limpos, sem lama ou sujidades, recomenda-se não lavar, apenas proceder ao “pre dipping” (CHAPPAVAL, 2007).

O “pre dipping” consiste na imersão dos tetos dos animais em solução desinfetante antes da ordenha, para diminuição da flora ambiental e impedir que os microrganismos penetrem no úbere no momento do refluxo de leite na colocação das teteiras. Neste procedimento podem ser utilizados: iodo (0,5%), hipoclorito (4,0%), clorhexidine (0,5-1,0%), cloro (0,3-0,5%), entre outras substâncias. Em seguida os tetos devem ser enxutos com toalhas de papel descartáveis (ibid.).

No “pos dipping” os tetos são imersos em solução sanitizante, principalmente em solução iodoglicerinada logo após a ordenha, o que reduzirá os riscos de mastite contagiosa, uma vez que há a diminuição da flora microbiana presente nos tetos dos animais (ibid.).

Fatores relacionados ao manejo e às instalações dos rebanhos também são pontos importantes a serem avaliados. A umidade excessiva e a insuficiente

renovação das camas podem favorecer a proliferação microbiana. Além disso, construções de instalações não adequadas podem ocasionar o surgimento de lesões traumáticas no úbere (MOTA, 2008).

A higiene pessoal do ordenhador também é de suma importância em relação à sanidade do úbere do animal. É essencial que ele mantenha suas unhas e cabelos limpos e cortados, uniforme limpo e apropriado, e que utilize botas plásticas (CHAPAVAL; OLIVINDO, 2008).

Para a obtenção de resultados satisfatórios nos rebanhos caprinos é necessário que haja a conscientização dos produtores sobre os prejuízos ocasionados pela mastite a fim de que adotem medidas preventivas e de controle contra a enfermidade, estabelecendo maior renda ao final do período de lactação dos animais.

2.5 VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)

A Artrite Encefalite Caprina é uma enfermidade incurável, degenerativa, com evolução lenta e de alta prevalência nos rebanhos caprinos nacionais. O agente etiológico foi identificado no início da década de oitenta como um RNA-vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae* (ANDRIOLI et al., 2006; FRANKE, 1998).

Trata-se de uma doença infecciosa específica dos caprinos que geralmente se apresenta de forma crônica, caracterizada por um longo período de incubação, e os animais infectados passam a ser portadores permanentes do vírus. A doença pode se manifestar por quadros clínicos de artrite, encefalite, mastite, pneumonia e emagrecimento crônico. O vírus pode estar presente em todos os líquidos corporais do animal acometido (FRANKE, 1998).

O CAEV foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA), por Cork et al. (1974) da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados (CRAWFORD et al., 1980). No Brasil, a primeira descrição sobre a CAE foi realizada por Moojen et al. (1986), no Rio Grande do Sul, seguido de Fitterman (1988) na Bahia, Pinheiro (1989) em Pernambuco e, Assis e Gouveia (1994) no Ceará (ALMEIDA et al., 2001). Segundo Saraiva Neto (1994), a doença introduziu-se no Brasil pela importação de animais puros de raças leiteiras, provenientes de rebanhos europeus e americanos.

Inquéritos sorológicos revelaram que o vírus está disseminado nos rebanhos caprinos de quase todos os países que praticam tradicionalmente a caprinocultura leiteira e que há estimativas da queda na produção de leite das cabras infectadas ser de 10 a 15%, sendo esta percentagem observada, também, nas ocasiões em que os animais infectados não apresentam alterações no úbere (KRIEG; PETERHANS, 1990; FRANKE, 1998).

Tal enfermidade tornou-se importante pelo impacto econômico decorrente de grandes perdas na produtividade do rebanho, sendo as mais significativas: a mortalidade de animais jovens, a redução de peso e a diminuição na produção leiteira (KEENAN, 1999; SANTIN et al., 2002). As cabras soropositivas apresentam menor produção de leite e curto período de lactação. Pode ocorrer redução do índice de fertilidade, aumento do intervalo interpartos e maior descarte de caprinos do plantel (LARA, 2005).

Para Contreras et al. (2001) a principal via de transmissão da CAE ocorre mediante a ingestão de colostro ou leite procedente de fêmea infectada, sendo que também pode ocorrer transmissão de forma horizontal pela ordenha mecânica.

Segundo os autores, o CAEV apresenta tropismo pela glândula mamária e pode ocasionar mastite do tipo parenquimatosa. A forma clínica de CAE que aparece com maior frequência é a do tipo articular e na maioria dos casos a presença do vírus passa de forma despercebida nos rebanhos infectados. A infecção pelo vírus nos rebanhos caprinos apresenta grande repercussão econômica, uma vez que pode limitar as exportações de animais.

A forma mamária da CAE é frequente e apresenta grande significado econômico em rebanhos caprinos leiteiros devido ao comprometimento da produção de leite e predisposição a infecções secundárias da glândula mamária. As cabras afetadas poderão apresentar mastite aguda ou crônica, sendo que na aguda, geralmente observada antes da lactogênese, há endurecimento não edematoso do úbere e uma baixa ou nenhuma produção leiteira. Já na crônica, observada durante a lactação, há endurecimento e assimetria da mama e o leite aparece com aspecto normal. Em ambas as formas há hipertrofia persistente dos linfonodos retromamários e histologicamente se observa mastite intersticial com presença de nódulos linfóides (CALLADO et al., 2001).

Vários estudos em diversos países são realizados no sentido de adequação de medidas para o controle da CAE. Como inexitem vacinas para a enfermidade, as

medidas profiláticas são de extrema importância para prevenir a ocorrência e adequar condições de convivência com a doença (VESCHI, 2005).

Dentre as medidas profiláticas adotadas destacam-se: fornecimento de colostro tratado termicamente aos cabritos; utilização de seringas descartáveis; desinfecção de materiais que entrem em contato direto com o sangue dos animais; realização de testes sorológicos periódicos nos rebanhos e a separação dos animais positivos (FRANKE, 1997).

2.6 DIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

Para o controle efetivo da CAE é importante que os métodos de diagnóstico identifiquem todos os animais portadores, uma vez que a manutenção de animais falso-negativos no rebanho representa problema sanitário e dificulta o controle da doença (ANDRIOLI et al., 2006).

O diagnóstico dessa infecção viral é baseado na sorologia, sendo a prova de escolha a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), embora nos últimos anos essa técnica esteja sendo substituída por diferentes modalidades de ELISA, com menores parâmetros de validade diagnóstica. Porém, nem todos os animais infectados se apresentam soropositivos, devido aos fenômenos de soroconversão tardia (CONTRERAS et al., 2001).

Embora a IDGA seja a principal forma de detecção de animais infectados pelo CAEV e o teste indicado pela “World Organization for Animal Health” (OIE), possui um valor limitado na identificação de animais em fase inicial da infecção (FROTA et al., 2005). Por isso, para o diagnóstico precoce da enfermidade, técnicas moleculares de detecção viral têm sido aplicadas, dentre elas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cujo objetivo é a amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos, permitindo a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA, não necessitando de nenhuma resposta do organismo, como a produção de anticorpos (BARLOUGH et al., 1994; ANDRIOLI et al., 2006).

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA proviral dos lentivírus de caprinos em diferentes amostras: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos e sêmen (REDDY et al., 1993; RIMSTAD et al., 1994; BARLOUGH et al., 1994; CLAVIJO; THORSEN, 1996; ANDRIOLI et al., 2006).

No caso dos lentivírus dos pequenos ruminantes (LVPR), CAEV e Maedi-Visna, a PCR é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou com resultado sorológico duvidoso (RIMSTAD et al., 1993). Porém, parece não haver relação entre o nível de anticorpos e o resultado positivo à PCR (BARLOUGH et al., 1994) e nem todas as amostras de sangue positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR (REDDY et al., 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES LABORATORIAIS

O estudo foi desenvolvido na Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Veterinária, no Laboratório de Epidemiologia Molecular, e no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

3.2 MODALIDADE DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente estudo foi realizado pelo método epidemiológico observacional transversal, estratificado pela positividade para CAE por IDGA, e a seleção dos rebanhos feita por conveniência (amostragem não probabilística), porém em cada rebanho os animais foram selecionados ao acaso. Os resultados obtidos foram apresentados nas formas de tabelas e as comparações e associações entre os parâmetros estudados foram realizadas pelos testes estatísticos de t-Student e t-Student não paramétrico aproximado de Welch's; regressão linear múltipla; regressão logística simples associada ao risco por *odds ratio*; regressão logística múltipla; qui-quadrado e concordância por Kappa, todos com base em intervalo de confiança de 95% (TRHUSFIELD, 2003).

3.3 CARACTERÍSTICAS DOS REBANHOS ESTUDADOS

Foram utilizados espécimes clínicos de 108 animais, obtidos de duas propriedades localizadas no município de Leopoldina, MG, identificados como rebanhos A e B.

Foram coletadas amostras de 63 cabras do rebanho A (Figura 1), todas puras ou mestiças da raça Saanen, e de 45 do rebanho B (Figura 2), puras ou mestiças das raças Parda Alpina e Saanen. Todos os animais se apresentavam em diferentes estágios de lactação e sem sintomatologia clínica. O diagnóstico da mastite clínica foi realizado pelo exame clínico do animal, da glândula mamária e retirada dos três primeiros jatos de leite em caneca telada, conforme recomendado pelo “National Mastitis Council” (1999) para a observação de alterações macroscópicas do leite como grumos, coágulos, pus e sangue. Em ambas as propriedades a ordenha era realizada duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde e o sistema adotado era do tipo manual (Figuras 3, 4 e 5).



Figura 1 Cabras puras ou mestiças da raça Saanen do rebanho A, Leopoldina, MG, 2009.



Figura 2 Cabras mestiças das raças Parda Alpina e Saanen do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009.



Figura 3 Ordenha manual realizada no rebanho A, Leopoldina, MG, 2009.



Figura 4 Ordenha manual em cabras do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009.



Figura 5 Realização de “pos-dipping” após ordenha manual em cabras do rebanho B, Leopoldina, MG, 2009.

3.4 COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

Foram coletadas amostras de leite obtidas dos dois tetos (aproximadamente 50,0 mL) e sangue (2,0 mL) de 108 cabras sem sintomatologia clínica, selecionadas ao acaso, sendo 63 provenientes de rebanho IDGA positivo (A) e 45 de rebanho negativo (B), já testado duas vezes, segundo o proprietário.

As amostras de leite, por animal (Figura 6), foram dispensadas em frascos plásticos contendo o conservante bronopol[®] (Figuras 7 e 8), sendo acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo e enviados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, para a obtenção da CCS pelo método de citometria de fluxo e para a determinação de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, todos realizados por metodologia eletrônica.

O sangue dos animais foi coletado pela punção da veia jugular através de seringas de 5,0 mL com agulha, sendo que 1,0 mL foi dispensado em tubo com anticoagulante EDTA para a realização da PCR, e 1,0 mL de sangue foi acondicionado em tubo de ensaio sem anticoagulante para a obtenção do soro, necessário para a realização da IDGA.

3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A contagem de células somáticas foi realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, pelo método de citometria de fluxo. Para a sua realização foi utilizado o aparelho “Somacount 300 da Bentley Instruments USA” (Figura 9).

A análise físico-química de componentes do leite foi realizada pelo equipamento eletrônico “Bentley 2000 da Bentley Instruments USA” (Figura 9), o qual determina as porcentagens de gordura, proteína e lactose, por absorção infravermelha, e sólidos totais, por soma dos valores dos componentes anteriores (MACHADO et al., 2000; BENTLEY, 1995 a, b).



Figura 6 Coleta de amostra de leite de cabra do rebanho A. Leopoldina, MG, 2009.



Figura 7 Frascos com pastilha do conservante bronopol[®] para CCS.



Figura 8 Frascos contendo amostra de leite para CCS. A. Etiqueta com identificação por cabra e frasco coletor. B. Frascos já etiquetados.



Figura 9 Equipamentos eletrônicos “Somacount 300” e “Bentley 2000” da Bentley Instruments Incorporated®, Minnesota, EUA, utilizados para a CCS e determinação de componentes físico-químicos em amostras de leite.

Fonte: EVANGELISTA, 2008.

3.6 DIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

3.6.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

As amostras de sangue foram dessoradas em temperatura ambiente e/ou centrifugadas (20.000Xg) por cinco minutos, quando necessário, para a obtenção final dos soros, os quais foram armazenados a -20°C até o momento de uso. Os soros foram submetidos ao teste de IDGA para diagnóstico da CAE, pela utilização de kit comercial (Kit Biovetech[®], Recife, PE) para a detecção de anticorpos anti28 em soros de caprinos.

O frasco com agarose, pertencente ao kit, foi aquecido em água fervente até a total fluidificação da mesma. Com a utilização de pipeta de 10,0 mL pré-aquecida, foram distribuídos 4,5 mL de agarose em lâmina de microscopia de 25x75 mm. Após a completa solidificação da agarose, a mesma foi perfurada com uma roseta em forma hexagonal de maneira a formar sete poços, sendo um central e seis periféricos (Figura 10), nos quais foram distribuídos de forma alternada, o soro controle positivo e os soros a serem testados. Os poços destinados ao soro controle e ao antígeno possuíam 3mm de diâmetro, enquanto os destinados aos soros a serem testados 5mm, todos equidistantes a 2 mm (OIE, 2008).

Antígeno e soro controle positivo foram levemente homogeneizados com movimentos circulares e distribuídos de acordo com a sequência: nas seis cavidades periféricas, de maneira alternada, 30 µL do soro teste e 10 µL do controle positivo; e 10 µL do antígeno (Ag) na cavidade central. Após a distribuição dos reagentes, as lâminas foram incubadas em atmosfera úmida (placas de Petri) a aproximadamente 25°C por 48 horas. A primeira leitura foi realizada após 24 horas de incubação e a leitura definitiva após 48 horas. As lâminas foram observadas sobre um fundo preto, com o auxílio de uma fonte luminosa.

As reações foram avaliadas pela presença de linhas de identidade com a linha de precipitação, obtida entre o antígeno e o soro controle positivo, e o tipo de reação variou com a concentração da amostra testada. A linha formada com o controle positivo serviu de base para a leitura do teste, estabelecendo-se as possibilidades a seguir:

- Reação negativa: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle positivo dirigiram-se para a cavidade onde se encontravam as amostras testadas;
- Reação positiva: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle positivo fundiram-se com aquelas formadas pelas amostras testadas e formaram uma linha contínua de identidade total;
- Reação fraca positiva: a linha de precipitação se formou mais próximo da cavidade onde se encontrava a amostra que estava sendo testada;
- Linhas inespecíficas: a reação inespecífica não forma uma linha contínua com as do controle. São formadas por outras reações entre antígeno e anticorpo que não aquela específica para o CAEV.

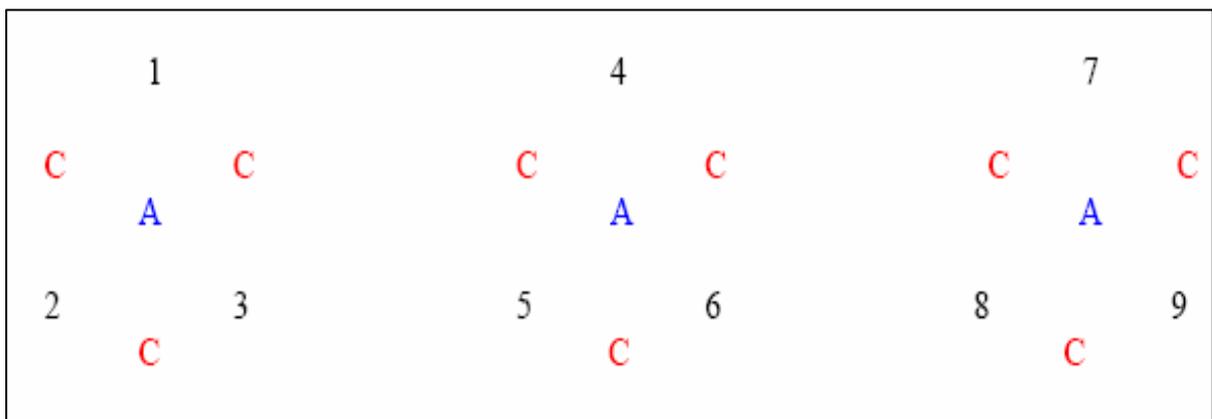


Figura 10 Esquema de lâmina utilizada no diagnóstico da CAE pela técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), na qual: A - poço para colocação do antígeno; C - poço para disposição do soro controle; 1 a 9 - poços para os soros a serem testados.

3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração do DNA foi realizada a partir de sangue com anticoagulante EDTA conforme Sambrook et al. (1989) com algumas modificações (Anexo 8.1). O DNA purificado foi estocado em “freezer” a -20°C.

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), sendo P1= 5'CAA GCA GCA GGA GGG AGA AGC TG3' (posição genômica 953-975) e P2= 5'TCC TAC CCC CAT AAT TTG ATC CAC3' (posição genômica 1249-1226) descritos por Barlough et al. (1994), os quais amplificaram um fragmento alvo de 297 pb. Em seguida foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores internos P3= 5'GTT CCA GCA ACT GCA AAC AGT AGC AAT G3' (posição genômica 997-1024) e P4= 5'ACC TTT CTG CTT CTT CAT TTA ATT TCC C3' (posição genômica 1181-1154) para a segunda amplificação ("Nested" PCR) para a obtenção de "amplicon" de 185pb (RIMSTAD et al., 1993; ANDRIOLI et al., 2006). A reação consistiu de um volume total de 50µL (Anexo 8.2) 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 (Quadro 2) foram realizadas em termociclador (Thermo Electron Corporation) com as seguintes etapas: um ciclo inicial para desnaturação a 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; seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos e término a 4°C.

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.

Quadro1 Reação em Cadeia da Polimerase e “Nested” PCR para a detecção do lentivírus caprino (CAEV).

Primers	Seqüência de nucleotídeos	Posição genômica	Nº pares base
P1 *	5'CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG3'	953-975	23pb
P2 *	5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC3'	1249-1226	24pb
P3 **	5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG3'	997-1024	28pb
P4 **	5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3'	1181-1154	27pb

* Barlough et al., 1994

** Rimstad et al. 1993

Fonte: Andrioli et al., 2006.

Quadro 2 Programação da PCR e “Nested” PCR para o CAEV.

Etapa	Programação
Estágio 1	94°C / 5min
Estágio 2	35 ciclos: 94°C / 1min 53°C / 1min 72°C / 45 seg
Estágio 3	72°C / 7 min
Estágio 4	4°C até a coleta da amostra

4 RESULTADOS

4.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Segundo Philpot e Nicherson (1991), a CCS está diretamente relacionada com uma estimativa de perda de leite (em Kg) por lactação em vacas, de acordo com o quadro 3.

Quadro 3 Estimativa da perda de leite por lactação em vacas segundo as classes de CCS.

Classe de CCS (mil/mL de leite)	Estimativa de perda (Kg)/lactação
1 - 0 a 70	0
2 - 71 a 140	180
3 - 141 a 282	359
4 - 283 a 565	539
5 - 566 a 1130	719
6 - 1131 a 2262	898
7 - 2263 a 4525	1078
8 - acima de 4525	1257

Philpot; Nicherson, 1991.

No presente estudo, as frequências de cabras por classe de CCS entre os rebanhos estudados (A e B) foram significativamente diferentes, com mais animais do rebanho A nas faixas de maior perda de leite ($p < 0,05$).

Nesse trabalho, 37,29% (22/59) dos animais do rebanho A e 14,29% (5/35) do rebanho B apresentaram CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite (Tabela 3).

Tabela 3 Distribuição do número de animais de acordo com as classes de CCS nos rebanhos A e B.

Classe de CCS* (mil/mL leite)	Perda de leite por nº de cabras estudadas	
	Rebanho A*	Rebanho B*
	Nº de animais	Nº de animais
71 a 140	5	5
141 a 282	13	8
283 a 565	11	6
566 a 1130	8	11
1131 a 2262	12	2
2263 a 4525	4	3
acima de 4525	6	0
Total	59**	35**

* Teste de Qui-quadrado para independência ($p < 0,05$).

** 4 animais do rebanho A e 10 do B (com faixa de CCS entre 0 e 70) não apresentaram perda significativa de leite (Quadro 3).

De acordo com o teste não paramétrico t-Student aproximado de Welch's, houve diferença para a CCS entre os dois rebanhos ($p < 0,05$), sendo significativamente maior no rebanho A (Tabela 4).

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos, gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e de CCS do leite dos rebanhos estudados foram analisados pelo teste t-Student, observando-se diferença significativa ($p < 0,05$) somente em relação à proteína (Tabela 4).

Tabela 4 Valores médios dos componentes físico-químicos do leite de cabra e de CCS dos rebanhos analisados.

Rebanho	Gordura*		Proteína*		Lactose*		EST*		ESD*		CCS (10 ³ células/mL)*	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
A (N=63)	2,15	0,71	3,18	0,53	4,09	0,76	10,27	0,94	8,11	0,59	1505	2374,10
B (N=45)	2,02	0,48	2,97	0,37	4,25	0,23	10,06	0,84	8,04	0,55	591,6	889,27

* t-Student e t-Student aproximado de Welch's (p<0,05).

M: Média

DP: Desvio Padrão

N: número de amostras

Para a associação da CCS com os parâmetros físico-químicos utilizou-se o teste de regressão linear múltipla, obtendo-se a seguinte equação:

$$Y = 4457,5 + 3479,1 X_1 - 8220,5 X_2 - 12753 X_3 - 3692,1 X_4 + 13039 X_5,$$

na qual: Y= CCS; X1= gordura; X2= proteína; X3= lactose; X4= EST; e X5= ESD.

De acordo com o Coeficiente de Determinação ($r^2 = 0,6573$), a variação na CCS foi justificada em 65,73% pelo conjunto das cinco variáveis físico-químicas analisadas. Ainda pela equação, os valores elevados de gordura e ESD são preditivos de CCS elevada. O contrário ocorre para proteína, lactose e EST, os quais se apresentam inversamente proporcionais ao valor de CCS (p<0,05).

4.2 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Dos animais estudados, 14,8% (16/108) apresentaram resultado positivo na sorologia para CAE e todos os positivos foram provenientes do rebanho A.

Todos os animais do rebanho B apresentaram resultado negativo à IDGA.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Das amostras de sangue analisadas, 35,18% (38/108) apresentaram resultado positivo na PCR, todas provenientes do rebanho A. Desse total, 14 também obtiveram positividade na sorologia. Somente duas das dezesseis amostras positivas pela IDGA não foram confirmadas pela PCR (Tabela 5).

Foram testados dois pares de “primers”, sendo P1 e P2 oligos externos utilizados na primeira amplificação e, P3 e P4 oligos internos utilizados na segunda amplificação (“Nested” PCR).

Ao término da segunda amplificação foi gerado um “amplicon” de 185pb (Figura 11).

De acordo com o teste de Kappa, a concordância entre IDGA e PCR foi de 25%, considerada fraca, o que indica que os dois testes não estão relacionados, $p < 0,05$ (Tabela 5).

Tabela 5 Concordância entre IDGA e PCR para CAE em cabras do rebanho A pelo teste de Kappa ($p < 0,05$).

	IDGA +	IDGA -	TOTAL
PCR +	14	24	38
PCR -	2	23	25
TOTAL	16	47	63

Considerando a PCR como diagnóstico padrão para CAE, foi estabelecida a validade da IDGA, obtendo-se sensibilidade de 36,84%; especificidade de 92%; valor preditivo dos positivos de 87,50%; valor preditivo dos negativos de 48,94% (Tabela 6).

Tabela 6 Validade do IDGA para CAE utilizando PCR como padrão ($p < 0,05$).

	CAE +	CAE -	TOTAL
IDGA +	14	2	16
IDGA -	24	23	47
TOTAL	38	25	63

Ao se relacionar a positividade para CAE por IDGA e/ou PCR com os valores físico-químicos por meio de regressão logística múltipla não houve relação significativa ($p>0,05$).

Por outro lado, a associação da CCS com a positividade para CAE por IDGA e/ou PCR através de regressão logística simples apresentou relação significativa ($p<0,05$), donde obteve-se a seguinte equação:

$$\text{Logit } P_i = -4,6149 + 1,9054 X_1 \quad (\text{antilog} = 80,4266)$$

O risco (*odds ratio*) de animais positivos para o CAE apresentarem CCS elevada foi 6,7 maior quando comparado às cabras não infectadas.

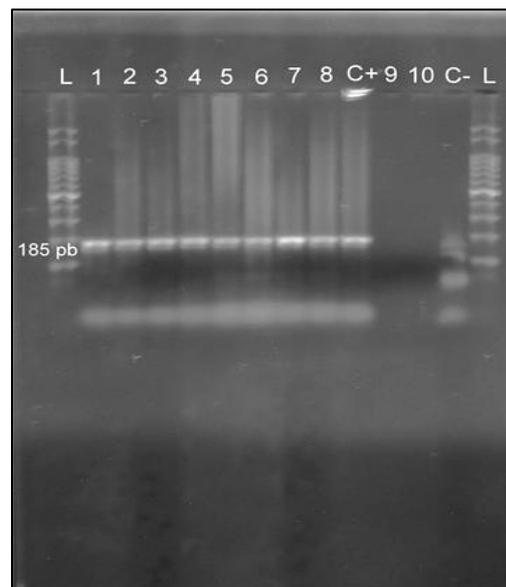


Figura 11 Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV. PCR de amostras de sangue, sendo L: marcador DNA Ladder; 1 a 8: amostras positivas com bandas de 185 pb; 9 e 10: amostras negativas; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo não se evidenciou animais positivos para mastite no exame clínico, sendo obtidos os valores médios de CCS de 1505 e 591,6 (mil células/mL de leite) nos rebanhos A e B respectivamente. No Brasil não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite de cabra, porém, atualmente, 1.000.000 células/mL é o limite regulamentado em rebanhos de excelência nos EUA (SOUZA et al., 2007).

Considerando que a espécie caprina apresenta fisiologicamente uma grande quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas, os valores para CCS encontrados neste trabalho reforçam a grande variação desse parâmetro em caprinos. Em cabras, a CCS pode sofrer variações devido à mastite, idade, fase de lactação, nível de produção de leite e infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (VILANOVA et al., 2008). Nesse estudo, a infecção por CAEV justificaria a diferença significativa ($p < 0,05$) entre a positividade para CAE por IDGA e/ou PCR e a CCS, com o risco (*odds ratio*) 6,7 vezes maior de cabras infectadas apresentarem CCS elevada.

Pelas análises físico-químicas realizadas nas amostras de leite de cabra provenientes dos rebanhos estudados foram observadas variações que estão de acordo ou não com os resultados de diferentes estudos. O teor de gordura do leite caprino é susceptível a oscilações provocadas por fatores como raça, turno de ordenha e período de lactação. Algumas raças se caracterizam pela baixa produção de leite com alto teor de gordura, como a raça Anglo-Nubiana, ou pela elevada quantidade de leite com baixo teor de gordura, como a raça Saanen.

Outros fatores, como a disponibilidade de determinados alimentos e a sazonalidade, também podem interferir na quantidade de gordura do leite de cabra (QUEIROGA et al., 2007). O valor médio de 2,15% no rebanho A e de 2,02% no rebanho B estão aquém de 2,70%, obtido por Queiroga et al. (2007) e de 2,60%, encontrado por Almeida (2009). Para o rebanho A, tal resultado poderia ser justificado pela positividade para o CAEV, uma vez que de acordo com Birgel Junior et al. (2007), ocorre uma redução na qualidade do leite de caprinos infectados por tal vírus, representados pela diminuição dos valores dos parâmetros físico-químicos. Porém, no presente trabalho, a relação da positividade para CAE por IDGA e/ou PCR com os resultados físico-químicos não foi significativa ($p > 0,05$), talvez devido ao número pequeno de animais trabalhados nesse estudo.

Os teores médios de proteína, 3,18% (rebanho A) e 2,97% (rebanho B) corroboram com os 3,19% encontrados anteriormente (BIRGEL JUNIOR et al., 2007) e 2,95% (CUNHA, 2007). Tais valores foram superiores aos relatados por Almeida (2009) e Queiroga et al. (2007), de 2,44% e 2,70% respectivamente.

A lactose é um dos nutrientes mais estáveis na composição química do leite e está diretamente relacionada à regulação da pressão osmótica (QUEIROGA et al., 2007). Goetsch et al. (2001) verificaram que o teor de lactose foi influenciado pelos diferentes níveis de concentrado da dieta, apresentando diferenças ao longo da lactação em animais com parição tardia, o que não foi observado nos animais com parição precoce. Os valores observados para lactose de 4,09% (rebanho A) e 4,25% (rebanho B) estão aquém do mínimo de 4,30% exigido pela IN nº 37 (BRASIL, 2000). No entanto, estão de acordo com os achados de 4,23% (CUNHA, 2007), 4,29% (BIRGEL JUNIOR et al., 2007) e 4,10% (QUEIROGA et al., 2007). Porém tais valores foram inferiores a 4,90% relatado por Almeida (2009).

O EST é representado pela gordura, açúcar, proteínas e sais minerais, sendo um indicador importante devido à exigência de padrões mínimos no leite e pela influência no rendimento de produtos lácteos, podendo-se observar que o pagamento do leite ocorre em função do extrato seco, especificamente gordura e proteína (PEREIRA et al., 2005). Os valores de 10,27% e de 10,06%, obtidos respectivamente nos rebanhos A e B aproximam-se ao achado de 10,26% de Vilanova et al. (2008). Porém são inferiores aos encontrados por Almeida (2009), Birgel Junior (2007), Cunha (2007) e Queiroga et al. (2007), de 10,82%; 12,99%; 11,81% e 11,4% nessa ordem.

Os valores médios para ESD de 8,11% (rebanho A) e de 8,04% (rebanho B) estão abaixo dos 8,20% preconizados pela IN nº 37 (BRASIL, 2000). Porém foram compatíveis ao obtido por Almeida (2009), de 8,19% e superiores a 7,99% encontrado por Queiroga et al. (2007).

A utilização dos dois pares de oligonucleotídeos P1 e P2, descritos por Barlough et al. (1994) e P3 e P4, descritos por Rimstad et al. (1993), geraram na segunda amplificação um “amplicon” de 185 pb, semelhante ao estudo de Andrioli et al. (2006).

A PCR se mostrou um bom método para diagnóstico do CAEV no rebanho A, visto que conseguiu detectar o provírus em 24 animais com resultado negativo na IDGA. Tal técnica também foi consistente ao confirmar o rebanho B como negativo para CAE, uma vez que tais animais obtiveram três resultados negativos na sorologia.

De acordo com os valores preditivos pela validação da IDGA, somente 87,50% de cabras com CAE são diagnosticadas, enquanto que 48,94% das cabras sem CAE são negativas. A sensibilidade baixa não inviabiliza a utilização deste teste no monitoramento da CAE, uma vez que com diagnósticos consecutivos e eliminação dos reagentes é possível obter rebanhos livres da doença de forma gradativa. Já a especificidade alta permitiria o controle da CAE nos rebanhos com baixo risco de eliminação de animais falso positivos.

A fraca concordância entre IDGA e PCR no rebanho A é também relatada por diversos autores. Segundo Andrioli et al. (2006), o baixo coeficiente de positividade na IDGA pode ser justificado pelo fato do nível de anticorpos circulantes variar entre animais e no mesmo animal, em virtude de seu estado fisiológico. Na IDGA, a reação positiva somente ocorre até determinado nível de anticorpos, de forma que se este estiver abaixo do detectável, o animal se torna falso negativo ao teste.

Achados semelhantes no que diz respeito a animais soropositivos para CAE não serem confirmados pela PCR foram também obtidos por Rutkoski et al. (2001). Nesse caso, há a possibilidade da carga viral estar presente em baixas concentrações em função dos altos títulos de anticorpos detectados. Tal fato explicaria um número pequeno de células contendo o provírus, diminuindo a possibilidade de detecção na PCR. Além disso, cabe ressaltar que diferente do que ocorre para os lentivírus indutores de imunodeficiência, o CAEV não infecta

linfócitos, mas sim monócitos, células que constituem apenas 10% dos leucócitos circulantes no sangue periférico.

6 CONCLUSÕES

A variação na CCS foi bem justificada pelo conjunto das cinco variáveis físico-químicas analisadas, apresentando relação diretamente proporcional com gordura e ESD, e inversamente com proteína, lactose e EST.

Foi constatado que a positividade para CAE influenciou a elevação da CCS, pela regressão logística simples, porém não influenciou os resultados das análises físico-químicas, pela regressão logística múltipla.

A PCR foi consistente em produzir resultados negativos em cabras com diagnóstico negativo pela IDGA.

A obtenção de três resultados negativos na IDGA foi considerado suficiente para a definição do estado de negatividade para CAE.

Houve baixa concordância entre IDGA e PCR pelo teste de Kappa.

Os valores de sensibilidade, especificidade e preditivos da IDGA foram baixos, tendo em vista a PCR como padrão.

7 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.

ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIACÃO, A. V. M.; FIGUEREDO, A.; MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S. Dados sorológicos sobre a presença e a distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 1, n. 3, p. 78-83, 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.embrapa.br/cot72.pdf>>. Acesso em 14 nov. 2008.

ASSIS, A. P. M. V.; GOUVEIA, A. M. G. Evidência sorológica de *Lentivírus* (Maedi Visna/CAEV) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA, CE. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 1994, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1994. p. 46.

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.

BARROS, G. C.; LEITAO, C. H. S. Influência da mastite sobre as características físico-químicas de leite de cabra. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 12, n. 3/4, p. 45-48, 1992.

BENTLEY INSTRUMENTS. Bentley 2000 Operator's Manual. Chaska, p.77, 1995a.

BENTLEY INSTRUMENTS. Somacount 300 Operator's Manual. Chaska, p.12, 1995b.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2193>>. Acesso em 18 nov. 2008.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Controle da mastite – ou como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/...leite/arquivos/controlarmastite.doc>>. Acesso em 14 dez. 2009.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, jul./set. 2001.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P. R. Tecnologia dos produtos de origem animal e qualidade do leite. In: ASSIS VIEIRA, E. *Leite de qualidade: manejos reprodutivos, nutricionais e sanitários*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, cap. 8, p. 115-175, 2000.

CHAPAVAL, L. Qualidade do leite. In: SANTANA, A. M. O. *Manual do produtor de cabras leiteiras*. Viçosa, MG: Editora Aprenda Fácil, cap. 7, p. 157-212, 2006.

CHAPAVAL, L. Programa de Controle da Mastite Caprina – PCMC. Comunicado Técnico, EMBRAPA. Sobral, CE, out. 2007. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/cot80.pdf>>. Acesso em 20 nov. 2008.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C. S. Programa ovino-caprino Paraná. Manejo de ordenha: ponto importante para obtenção de leite de cabra de qualidade. Disponível em: <<http://www.ovinocaprino.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=21#02>>. Acesso em 20 nov. 2008.

CLAVIJO, A., THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Ruminant Research*, v. 22, p. 69-77, 1996.

CLEMENTS, J. E., PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Research*, v. 32, p. 97-109, 1994.

CONTRERAS, A. et al. Diagnostico indirecto de las mamitis caprinas. *Tratado de patologia y producción ovina: Mamitis caprinas II*, n. 54, p. 25-36, 1998.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ LÓPEZ, A.; CORRALES, J.C. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. In: XXVI Jornada Científica de la SEOC, Sevilla, p. 71-83, 2001.

CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. Leite de cabra no Brasil, seu mercado, comercialização e produção. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana, Espírito Santo do Pinhal, maio 2009.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v. 1, p. 3-9, 1998.

CRAWFORD, T.B. et al. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *American Journal of Pathology*, v. 100, n. 2, p. 443-454, 1980.

CULLOR, J. S., TYLER, J. W., SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. *Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais*. São Paulo, v.2, p.1041-1060, 1994.

CUNHA, F. L. *Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ, metodologia tradicional versus metodologia eletrônica*. Niterói, 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

DUBEUF, J. P. Structural, market and organizational conditions for developing goat dairy production systems. *Small Ruminant Research*, v. 60, p. 67-74, 2005.

EVANGELISTA, D. T. *Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos*. Belo Horizonte, 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FERNANDES, M. F. *Qualidade do leite de cabras mestiças moxotó suplementadas com diferentes fontes e níveis de óleos vegetais*. Areia, 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2007.

FITTERMAN, I.R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, 1988, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1988. p. 93.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2006. Statistical databases. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>. Acesso em 15 nov 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO [2007] FAOSTAT – FAO Statistics Division/Prod STAT: livestock (primary and processed). Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/596/DesktopDefault.aspx?PageID=569>>. Acesso em 25 ago 2008.

FRANKE, C. R. *Controle sanitário da artrite-encefalite caprina (C.A.E.)*. Salvador: EDUFBA, 1997. 70 p.

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

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; DA SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, abr./jun.2005.

FROTA, M. N. L.; SILVA, J. B. A.; ARAÚJO, S. A. C; TEIXEIRA, M. F. S. Artrite Encefalite Caprina em cabritos de rebanhos com programa de controle no Estado do Ceará. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, p. 147-152, abr./jun., 2005.

FURTADO, M. M. Leite de Cabra: características especiais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 36, n. 214, p. 31-37, 1981.

GOETSCH, A. L., DETWEILER, G.; SALHU, T. Dairy goat performance with different dietary concentrate levels in late lactation. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 117-125, 2001

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

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; VIEIRA, R. A. M.; HENRIQUE, D. S.; MANCIO, A. B.; PEREIRA, J. C. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.2, p.366-376, 2008.

HAENLEIN, 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 2008 (PPM 2008). Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/?noticialID=58690&actA=7&areaID=1&secaoID=10>>. Acesso em 05 dez. 2009.

KEENAN, F. K. Goat diseases: caprine retrovirus. DPI note, Department of Primaty Industries Queensland, 1999. Disponível em: <<http://www.dpi.qld.gov.au/dpinotes/animals/gats/aph99001.htm>>. Acesso em 20 out. 2008.

KRIEG, A.; PETERHANS, E. Die Caprine Arthritis-Encephalites in der Schweiz: Epidemiologie und Klinische Untersuchung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, v.132, p.345-352, 1990.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L.; BIRGEL, L.H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.

LEROUX, C., CHASTANG, J., GREENLAND, T. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives Virology*, v. 142, p. 1125-1137, 1997.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.

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 out. 2008.

MARTINS, E. C.; WANDER, A. L.; CHAPAVAL, L.; BONFIM, M. A. D. O Mercado e as Potencialidades do Leite de Cabra na Cidade de Sobral: A Visão do Consumidor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 2007, Fortaleza. *Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social: anais*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 15 f.

MBILU, T. J. N. K. Status of mastitis in lactating goats at Sokoine University of agriculture and neighbouring smallholder farms in Morogoro Municipality, Tanzania. *Livestock Research for Rural Development*, Tanzania. v. 19, n. 3, art.40, mar. 2007. Disponível em:<<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd19/3/mbil19040.htm>>. Acesso em 15 ago 2008.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P. Evidência de infecção pelo *Lentivírus* (Maedi-Visna/Artrite- Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS*, v.14, p.77-78, 1986.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE ANIMAL (OIE). Manual of Standards Diagnosis Tests and Vaccines 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/ENG/normes/en_mmanual.htm>. Acesso em 22 out. 2008.

PAES, P. R. O.; LOPES, S. T. A.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHYRA, R. K.; LANGONI, H. 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*, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical

characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v.68, p.88-113, 2007.

PEREIRA, R. A. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; VIANNA, R. P. T.; OLIVEIRA, M. E. G. Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social "Pacto Novo Cariri" no Estado da Paraíba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 205-211, 2005.

PHILPOT, W.N., NICKERSON, S.C. *Mastitis: counter attack*. Naperville: Babson Bros. 1991. 150p.

PINHEIRO, R. R. Artrite-encefalite caprina viral (CAEV). Sobral, *Comunicado Técnico EMBRAPA-CNPC*, n.19, p.1-5, 1989.

QUADROS, D. G. Leite de cabra: produção e qualidade. *Pubvet*. v. 2, n. 1, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=110>>. Acesso em 19 ago. 2008.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

REDDY, P. G., SAPP, W. J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 11, p. 3042-3043, 1993.

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, jul./set., 2003.

RIBEIRO, S. D. A. Mercado e tecnologia de processamento. *Caprinocultura*. Criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997. 318p. Cap.11, p.249-270.

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 Veterinary Research*, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.

RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK, E., HIGGINS, J.; HIGGINS, J.; PEDERSEN, N. C. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Archives of Virology*, v. 134, p. 345-356, 1994.

RUTKOSKI, J. K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D.; WENDOLSTEIN, A. C.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com

“primers” degenerados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n. 6, Belo Horizonte, dez. 2001.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G., KONINGS, D. A. M.; VIGNER, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v. 179, p. 347-364, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTIN, A. P. I; BRITO, W. M. E. D.; REISCHAK, D.; BRITO, L. A. B. Artrite Encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 3, n. 1, p. 67-71, jan./jun. 2002.

SANTOS, M. V. Impacto econômico da mastite, 2001. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticialID=16201&actA=7&arealD=61&secaoID=180>>. Acesso 19 out. 2008.

SARAIVA NETO, A. O. *Soroprevalência da artrite encefalite caprina em caprinos leiteiros criados no Estado de Pernambuco*. Recife, 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1994.

SHEARER, J. K.; HARRIS JR., B. Mastitis in Dairy Goats. DS 85, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Jun. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em 08 out. 2008.

SILVEIRA, J. A. D. Leite de Cabra. São José dos Campos, SP. Disponível em: <<http://www.riocapri.com.br/artigo7.pdf>>. Acesso em 18 ago 2008.

SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D; RUBIALE, L. Contagem de Células Somáticas (CCS) em leite de cabra. *Panorama do Leite – Embrapa Gado de Leite*, ano 2, n.10, ago.2007. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade10.html>>. Acesso em 07 out. 2008.

THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. 2. ed. USA: Blackwell Science, 2003. 479 p.

VESCHI, J. L Artrite Encefalite Caprina – CAE. In: VIII Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Média Mogiana, Espírito Santo do Pinhal, SP, maio 2005. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/pdf/artrite_encefalite_caprina_cae.pdf>. Acesso em 20 out. 2008.

VILANOVA, M.; GONÇALVES, M.; OSÓRIO, M. T. M.; ESTEVES, R.; SCHMIDT, V. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras Saanen. *Acta Scientiae Veterinarie*, v. 36, n. 3, p. 235-240, 2008.

8 ANEXOS

8.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE

Material necessário:

- Tubos de polipropileno de 1,5 mL para microcentrífuga
- Jogo de micropipetas com ponteiros estéreis
- Banho-maria a 65°C
- “Vortex”
- Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL
- Estufa a 37° C
- Amostra
- Água ultrapura
- Proteinase K (20 mg/mL)
- SDS 10%
- Clorofórmio
- Solução de precipitação protéica*
- Etanol absoluto gelado
- Etanol 70% gelado

Fórmula dos reagentes:

- **SDS 20%**
 - 2 g de SDS
 - H₂O q.s.p. 10 mL

- ***Solução de precipitação protéica (7 mL) - Deve ser estocada a 4°C**
 - 3 mL de acetato de sódio (5 M). Utilizar 6,80g de acetato de sódio para 10 mL de água ultrapura.
 - 1,1 mL de Ácido acético glacial
 - 2,9 mL de água ultrapura

Metodologia:

Todos os procedimentos são realizados em temperatura ambiente.

- Descongelar e homogeneizar as amostras de sangue;
- Pipetar 175 µL de sangue em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- Adicionar 25 µL de Proteinase K (20 mg/mL);
- Homogeneizar e incubar a 65°C por 15 minutos em banho-maria;
- Remover o tubo do banho-maria e acrescentar 250 µL de SDS 10% (Dodecil Sufato de Sódio) e homogeneizar a amostra por inversão. Incubar a 65°C por 6 minutos em banho-maria;
- Adicionar 400 µL de clorofórmio e agitar em “vortex” vigorosamente.
- Adicionar 200 µL da solução de precipitação protéica e homogeneizar em “vortex”, até a amostra tornar-se uniformemente viscosa;
- Centrifugar em velocidade máxima por 10 minutos;
- Pipetar a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- Adicionar 500 µL de etanol absoluto gelado e homogeneizar por inversão até formar um precipitado, o qual deverá ser visto entre 30 e 60 segundos; se o precipitado não for visualizado, esperar mais 10 minutos;
- Centrifugar em velocidade máxima por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e adicionar 500 µL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos;

- Desprezar novamente o sobrenadante. Centrifugar em velocidade máxima por 1 minuto;
- Remover resíduos de etanol com o auxílio de uma pipeta e inverter os tubos para secagem;
- Adicionar 50 μL de água ultrapura ou tris-EDTA para cada tubo e homogeneizar levemente;
- Incubar a 65°C por 5 minutos em banho-maria;
- Estocar em “freezer” a -20°C.

8.2 CÁLCULO DOS REAGENTES UTILIZADOS NA PCR E “NESTED” PCR

CÁLCULO DOS REAGENTES DO MASTER MIX – 1º “ROUND”

Reagentes	Concentração de cada reagente para 1 amostra	Volume para 1 amostra
Água miliQ, autoclavada		q.s.p. 50 μL
Tris HCl + KCl + MgCl ₂	10, 50 e 1,5mM	5 μL
“Primer” 1	20pMol	2 μl
“Primer” 2	20pMol	2 μl
Desoxirribonucleotídeos (dNTP)	100 μM de cada	1 μl
Taq DNA Polimerase	2U	0,4 μl
Amostra (adicionar fora do fluxo laminar)		3 μL
	TOTAL	50 μL

q.s.p.=quantidade suficiente para

CÁLCULO DOS REAGENTES DO MASTER MIX – 2º “ROUND”

Reagentes	Concentração de cada reagente para 1 amostra	Volume para 1 amostra
Água miliQ, autoclavada		q.s.p. 50µL
Tris HCl + KCl + MgCl ₂	10, 50 e 1,5mM	5µL
“Primer” 3	20pMol	2µl
“Primer” 4	20pMol	2µl
Desoxirribonucleotídeos (dNTP)	100µM de cd	1µl
Taq DNA Polimerase	2U	0,4µl
Amostra (adicionar fora do fluxo laminar)		1µL
	TOTAL	50µL

q.s.p.=quantidade suficiente para