

Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular¹

Maria L.C.R. Silva², Roberto S. Castro³, Rita C. Maia³, Sergio A. Nascimento³, Ana Lisa V. Gomes³ e Sérgio S. Azevedo^{2*}

ABSTRACT- Silva M.L.C.R., Castro R.S., Maia R.C., Nascimento S.A., Gomes A.L.V. & Azevedo S.S. 2013. [**Lentivirus in dairy goats from the semiarid region of Paraíba state: seroprevalence, risk factors and molecular detection.**] Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(4):453-458. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-000, Patos, PB, Brazil. E-mail: ssazevedo@cstr.ufcg.edu.br

The aims of this study were to determine the seroprevalence of infection by ruminants *Lentivirus* in dairy goats in the semiarid of the Paraíba State, Northeastern Brazil, to identify risk factors associated with the herd-level prevalence and to perform molecular detection of the agent. A total of 1,047 dairy goats from 110 herds were randomly selected from the county of Monteiro, Paraíba State, and serum samples were collected from March 2009 to December 2011. For the diagnosis of *Lentivirus* infection, the agar gel immunodiffusion test (AGID) was used. One year after that a new serology was performed and the real-time PCR assay was applied in blood and milk samples from 48 goats from four herds with seropositive animals. Prevalence of positive herds and seropositive animals at AGID were 44.6% (95% CI=35.1-54.3%) and 8.1% (95% CI =5.6-16.8%), respectively. Umbilical cord cutting and disinfection (odds ratio = 2.44; p = 0.048) and conditions of animal agglomeration (odds ratio=3.45; p=0.048) were associated with herd-level prevalence. One year after the serological profile, the permanence of infected animals detected by real-time PCR in blood and milk samples was verified. Real-time PCR using white blood cells had a good performance, with sensitivity of 100%, specificity of 92.86%, concordance of 93.75% and Kappa index of 0.765. It was suggested to teach sanitary measures to the herd owners in order to encourage them to adopt prevention measures aiming to reduce the spread of the infection in the herds.

INDEX TERMS: Lentivirus, caprine arthritis-encephalitis, dairy goats, seroepidemiology, real-time PCR.

RESUMO.- Os objetivos do presente trabalho foram determinar a prevalência de caprinos leiteiros soropositivos para a infecção por *Lentivirus* de pequenos ruminantes no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, identi-

ficar fatores de risco associados à prevalência de rebanhos positivos, e realizar a detecção molecular do agente. Foram utilizadas 1047 cabras leiteiras de 110 propriedades selecionadas aleatoriamente no Município de Monteiro, Estado da Paraíba, no período de março de 2009 a dezembro de 2011. Para o diagnóstico da infecção por *Lentivirus*, foi utilizado o teste de imunodifusão em gel de ágar (AGID). Um ano após foi realizada nova sorologia, e PCR em tempo real foi aplicada em amostras de sangue e leite de 48 cabras procedentes de quatro propriedades com animais soropositivos. As prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos na AGID foram 44,6% (IC 95% = 35,1% - 54,3%) e 8,1% (IC 95% = 5,6% - 16,8%), respectivamente. Realizar corte e desinfecção de umbigo (*odds ratio* = 2,44;

¹ Recebido em 18 de dezembro de 2012.

Aceito para publicação em 7 de março de 2013.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

² Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária s/n, Patos, PB 58700-970, Brasil. *Autor para correspondência: ssazevedo@cstr.ufcg.edu.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

$p = 0,048$) e condições de aglomeração de animais (*odds ratio* = 3,45; $p = 0,048$) foram associadas com a prevalência de propriedades positivas. Um ano após a realização do inquérito sorológico, foi verificada a permanência de animais infectados, detectados por PCR em tempo real a partir de amostras de sangue e leite. A PCR em tempo real das amostras de leucócitos circulantes apresentou boa performance, com sensibilidade de 100%, especificidade de 92,86%, concordância de 93,75% e indicador Kappa de 0,765. Sugere-se que seja realizado um trabalho de educação sanitária junto aos produtores sobre medidas de prevenção com o objetivo de reduzir a disseminação da infecção nos rebanhos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Lentivírus, artrite-encefalite caprina, caprinos leiteiros, soropidemiologia, PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) compreendem o vírus da artrite encefalite caprina (*Caprine arthritis encephalitis virus* - CAEV) e o vírus Maedi-Visna, relacionados antigenicamente e fenotipicamente, pertencentes ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae* (Valas et al. 2000). A maioria dos casos de infecção por SRLV tem curso subclínico (Costa et al. 2007), causando perdas econômicas decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira, falhas reprodutivas, predisposição da glândula mamária a infecções bacterianas, retardo no crescimento das crias, mortalidade neonatal, descarte de animais doentes, desvalorização comercial dos produtos de criatórios com animais positivos e despesas com programas de controle (Greenwood 1995, Concha-Bermejillo 1997).

A infecção compromete vários sistemas como o locomotor, reprodutivo, respiratório e nervoso, apresentando evolução lenta, degenerativa e crônica, com sintomatologia variável, caracterizada por emagrecimento, artrite (principalmente na articulação carpo-metacarpiana), mastite e encefalites (Callado et al. 2001). Em caprinos, a principal via de transmissão é a ingestão de colostro e leite contaminados (Rowe & East 1997, Guedes et al. 2001, Blacklaws et al. 2004).

O diagnóstico laboratorial da infecção por SRLV é baseado primariamente na detecção de anticorpos contra proteínas estruturais dos vírus, e nesse contexto a imunodifusão em gel de ágar (AGID) é o teste mais utilizado (Karanikolaou et al. 2005). No entanto, os métodos para detecção de anticorpos podem apresentar baixa sensibilidade em decorrência da variação antigênica do vírus e da existência de animais que não desenvolvem resposta humoral. Dessa maneira, a utilização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção molecular do agente tem se mostrado uma alternativa importante aos métodos sorológicos (Leginagoikoa et al. 2009).

Os SRLV já foram detectados em diversos países, inclusive no Brasil, pela detecção de anticorpos ou isolamento dos agentes. No Brasil, a primeira descrição de ocorrência de lentivirose ocorreu no Estado do Rio Grande do Sul (Moojen et al. 1986). A partir daí, vários estudos demons-

traram a presença dessa infecção em caprinos em vários estados: Minas Gerais, Pernambuco, Ceará, Sergipe, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Sul, Paraná e Rio Grande do Norte (Callado et al. 2001, Pinheiro et al. 2001, Batista et al. 2004, Silva et al. 2005).

Apesar dos vários estudos conduzidos no território brasileiro apontarem a ocorrência de lentivirose em caprinos, não há estudos baseados em amostragem planejada no Estado da Paraíba. Dessa maneira, os objetivos do presente trabalho foram determinar a prevalência de propriedades positivas (focos) e de animais soropositivos, e identificar fatores de risco para a infecção por lentivírus em caprinos leiteiros no semiárido da Paraíba, bem como realizar diagnóstico direto pela detecção molecular do agente.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho foi conduzido durante o período de março de 2009 a dezembro de 2011 no Município de Monteiro (7°53'S, 37°5'W), mesorregião do Cariri Ocidental, semiárido do Estado da Paraíba. O clima da região é semiárido, com temperatura média de 22°C. A altitude é 599 metros acima do nível do mar. O município se destaca na produção de leite de cabra no Estado da Paraíba e no Brasil, com um total de 90 mil litros mensais, e possui o maior efetivo de caprinos do Estado, com 30.240 animais (Brasil 2009).

Delineamento amostral e colheita de amostras

O delineamento utilizado foi de um estudo transversal, e a amostragem foi delineada para a determinação da prevalência de propriedades positivas (focos) e de animais soropositivos, sendo realizada em duas etapas: (1) seleção aleatória de um número pré-estabelecido de propriedades (unidades primárias); (2) dentro das unidades primárias, foi amostrado, aleatoriamente, um número pré-estabelecido de caprinos (unidades secundárias).

Para o cálculo do número de unidades primárias a serem amostradas, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada de 50% (utilizada para a maximização da amostra); (b) erro absoluto de 5%; e (c) nível de confiança de 95%, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (Thrusfield 2007). De acordo com o Centro de Desenvolvimento Integrado da Ovinocaprinocultura da Paraíba (CENDOV), havia 155 propriedades de exploração de cabras leiteiras cadastradas. Com base nesses dados, o número de unidades primárias a serem visitadas foi de 110.

O número de animais testados para um rebanho ser classificado como positivo ou negativo foi calculado com base no valor de sensibilidade e especificidade agregadas (Donald et al. 1994). Dessa forma, o cálculo do número de unidades secundárias foi realizado com o programa Herdacc versão 3.0 (University of Guelph, Guelph), de modo a ser obtido um valor de sensibilidade e especificidade agregadas de pelo menos 90% (Jordan 1996), utilizando os seguintes parâmetros: a) sensibilidade e especificidade do teste de imunodifusão em gel de ágar (AGID) em nível individual, de 90% e 100%, respectivamente (Karanikolaou et al. 2005); b) tamanho do rebanho; c) ponto de corte 1, ou seja, número mínimo de animais positivos para classificar o rebanho como foco. Após várias simulações no programa Herdacc versão 3.0, optou-se pelos seguintes tamanhos amostrais:

- Propriedades com até 100 fêmeas adultas => foram amostrados 12 animais.

- Propriedades com mais de 100 fêmeas adultas => foram amostrados 13 animais.
- Propriedades com até 12 fêmeas adultas => foram amostrados todos os animais.

No total, foram amostradas 1047 fêmeas caprinas adultas procedentes de 110 propriedades. Foram colhidos 10 mL de sangue por punção da veia jugular utilizando tubos a vácuo. As amostras foram centrifugadas e os soros foram armazenados a -20°C até a realização da sorologia por AGID.

Um ano após a realização da AGID, foram selecionadas aleatoriamente por sorteio probabilístico 16 propriedades que apresentaram animais soropositivos no ano anterior, com colheita de sangue e leite de 179 fêmeas adultas. Foi realizada AGID nesses soros, e PCR em tempo real (qPCR) de leucócitos circulantes e leite de animais procedentes das propriedades que apresentaram pelo menos um animal soropositivo no segundo AGID. Foram colhidos 10 mL de sangue em tubos de vácuo heparinizados e 10 mL de leite. As amostras foram refrigeradas imediatamente, com processamento antes de completar seis horas após a colheita. O sangue heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 1500g a 4°C, a intercamada (anel de leucócitos - "buffycoat") foi coletada e adicionada a 10 mL de solução de lise para células vermelhas. Depois de 10 minutos de incubação à temperatura ambiente em rotação de *shaker*, centrifugou-se a 1500g por 10 min. O *pellet* foi ressuspenso em 200µL de PBS e congelado a -20°C. O leite foi centrifugado por 10 minutos a 1500g a 4°C, a camada de gordura e o soro foram removidos e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de PBS. O material foi transferido para outro tubo e adicionou-se 9mL de PBS, com posterior centrifugação por 10 minutos a 1500g a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 200µL de PBS e congelado a -20°C. As amostras foram descongeladas, agitadas em vórtex por 15 segundos, e em seguida foi feita a extração do DNA com o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), segundo a técnica descrita por Brinkhof et al. (2010).

Imunodifusão em gel de ágar (AGID)

Para o diagnóstico sorológico, foi utilizado o microteste de imunodifusão em gel de ágar (micro-AGID), de acordo com a orientação do fabricante (Biovetech, Recife, PE), utilizando-se como antígeno a proteína p28 do vírus da Artrite-Encefalite Caprina. O teste foi realizado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 16mL de agarose a 1%, com padrão de perfuração composto por seis orifícios na periferia e um no centro, e no poço central foi adicionado o antígeno (10µL), enquanto que nos poços periféricos foram adicionados, de forma alternada, soro padrão positivo (10µL) e soros a serem testados (30 µL). As placas foram incubadas a 25°C em câmara úmida, e leitura efetuada após 48 horas. Os soros foram considerados positivos quando ocorria a formação da linha de precipitação entre o poço central e o poço do soro testado, apresentando identidade com a linha formada entre o soro padrão positivo e o antígeno (OIE 2008).

PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) foi executada no termociclador *line - Gene K* (Bioer, China), com todas as amostras em reações em duplicatas. Inicialmente foi realizado o estudo de controle endógeno da amostra através da pesquisa do gene constitutivo (12S) para caprino (*housekeeping*) com os primers 12S-R 5'-TGAGTTTCGGGCTGTTGCCG-3' e 12S-F 5'-CGAGCCACCGCGTCATACG-3'. A reação foi composta por 12,5µL do master mix Syber green (Qiagen), 20pmol de cada primer, 2µL da DNA da amostra e 6,5µL de dH₂O, totalizando 25µL por microtubo. Após resultado positivo no *housekeeping* realizou-se a qPCR específica para lentivíroses,

com os primers CF2 5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' e CR2 5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3', que foram construídos a partir do gene *gag*, o qual é um gene conservado dos retrovírus, amplificando um fragmento de 185bp (Rimstad et al. 1993). As condições da reação foram as mesmas utilizadas para o gene constitutivo. Nas reações foram utilizados controles negativo (todos os reagentes menos a amostra de DNA) e positivo (para CAEV a amostra CAEV COR K e para o Maedi-Visna a amostra K 1514, isoladas de cultivo celular Cor FC da linhagem celular de córnea caprina imortalizada e desenvolvida no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, cujo DNA genômico de células infectadas foi diluído a 0,15ng/µL).

Análise dos dados

Para a análise de possíveis fatores de risco associados com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Lentivirus* foram utilizados os dados coletados nos questionários epidemiológicos (Quadro 1). Uma propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. A análise de fatores de risco foi conduzida em duas etapas: análise univariável e análise multivariável. Na análise univariável, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente, e aquelas que apresentaram valor de $p \leq 0,20$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram selecionadas para a análise multivariável, utilizando-se regressão logística múltipla. O ajuste do modelo final foi verificado com o teste de Hosmer e Lemeshow, cujo valor de $p > 0,05$ indica boa qualidade de ajuste (Hosmer & Lemeshow 2000). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 for Windows.

Foi realizada comparação dos testes de AGID e PCR em tempo real dos leucócitos e do leite, adotando como padrão-ouro a condição de animal infectado. Animais infectados foram arbitrariamente definidos como aqueles que apresentaram resultados positivos em no mínimo dois testes (Karanikolaou et al. 2005). Foram calculados sensibilidade, especificidade, concordância e indicador Kappa, com nível de confiança de 95%, utilizando o programa Dag Stat (Mackinnon 2000), e teste de hipóteses realizado com o teste de McNemar para amostras relacionadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, 49 rebanhos dos 110 pesquisados apresentaram pelo menos um animal soropositivo, com prevalência de 44,6% (IC 95%, 35,1-54,3%). Essa alta frequência de focos reflete a ampla distribuição do agente em rebanhos de caprinos leiteiros na região semiárida do estado da Paraíba, o que representa relevância do ponto de vista econômico, uma vez que a população-alvo incluiu propriedades de caprinos leiteiros de importante bacia leiteira, levando-se em consideração que prevalências elevadas de infecção por SRLV podem ter impacto negativo na produção de leite (Bandeira et al. 2009). No Brasil, outros inquéritos conduzidos em caprinos apontaram frequências variáveis de propriedades com animais soropositivos: Pinheiro et al. (2001), no Ceará, encontraram 4,6% (37/810) de propriedades positivas; Silva et al. (2005), no Rio Grande do Norte, encontraram 24 (57,14%) propriedades positivas entre 42 amostradas; e Bandeira et al. (2009), na Paraíba, pesquisaram 60 propriedades, das quais 21 (35%) apresentaram animais soropositivos.

Para animais, 85 cabras entre as 1047 examinadas foram soropositivas, com prevalência de 8,1% (IC 95%, 5,6-

Quadro 1. Análise univariável com as variáveis mais associadas ($p \leq 0,20$) com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Lentivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Variáveis	No. total de propriedades	No. de propriedades positivas (%)	p
Tipo de criação			
Intensiva	2	2 (100,0)	
Semi-intensiva	101	41 (40,6)	
Extensiva	7	3 (42,9)	0,270
Tipo de exploração			
Cria	82	33 (40,2)	
Recria/engorda	10	5 (50,0)	
Reprodução	8	3 (37,5)	
Subsistência	10	1 (10,0)	0,187*
Finalidade			
Corte	2	2 (100,0)	
Leite	99	42 (42,4)	
Mista	7	4 (57,1)	0,210
Tamanho do rebanho			
Até 31 animais	57	23 (40,4)	
Mais de 31 animais	53	26 (49,1)	0,359
Tempo de criação de caprinos			
Menos de um ano	2	2 (100,0)	
1 a 3 anos	20	7 (35,0)	
3 a 5 anos	21	10 (47,6)	
Mais de 5 anos	67	30 (44,8)	0,346
Raça de caprinos predominante			
Pura	7	2 (28,6)	
Mista	103	47 (45,6)	0,458
Compra de animais			
Não	75	30 (40,0)	
Sim	35	19 (54,3)	0,231
Utilizar centro de manejo			
Não	79	32 (40,5)	
Sim	31	17 (54,8)	0,251
Condições de aglomeração (cercas de boa qualidade)			
Não	18	4 (22,2)	
Sim	92	45 (48,9)	0,068*
Uso de monta natural			
Não	3	1 (33,3)	
Sim	107	48 (44,9)	1,000
Uso comum de reprodutor/sêmen de outras propriedades			
Não	67	28 (41,8)	
Sim	43	21 (48,8)	0,597
Realizar vermifugação dos animais			
Não	10	2 (20,0)	
Sim	100	47 (47,0)	0,180*
Realizar corte e desinfecção de umbigo			
Não	78	30 (38,5)	
Sim	32	19 (59,4)	0,073*
Realizar quarentena na introdução de animais			
Não	99	44 (44,4)	
Sim	11	5 (45,5)	1,000
Separar animais jovens de adultos			
Não	59	26 (44,1)	
Sim	51	23 (45,1)	1,000
Enterrar ou cremar animais mortos			
Não	102	41 (40,2)	
Sim	8	8 (100,0)	0,001*
Realizar higiene das instalações			
Não	62	25 (40,3)	
Sim	48	24 (50,0)	0,413
Realizar isolamento de animais doentes			
Não	72	30 (41,7)	
Sim	38	19 (50,0)	0,526
Utilizar piquetes de parição			
Não	101	46 (45,5)	
Sim	9	3 (33,3)	0,729
Uso de seringas descartáveis			
Não	50	23 (46,0)	
Sim	60	26 (43,3)	0,930
Realizar algum exame na compra de animais			
Não	107	46 (43,0)	
Sim	3	3 (100,0)	0,085*

* Variáveis selecionadas e usadas na regressão logística múltipla ($p \leq 0,20$).

16,8%). Essa prevalência encontra-se dentro da variação das frequências de animais soropositivos encontradas em vários estudos conduzidos em caprinos no Brasil, que apontaram valores de 8,2% no estado da Paraíba (Bandeira et al. 2009) a 14,1% no Rio de Janeiro (Lilenbaum et al. 2007). Por outro lado, vale ressaltar que o uso de amostragem por conveniência em estudos soroepidemiológicos é muito comum e permite o levantamento de informações importantes, no entanto, inferência epidemiológica não deve ser feita a partir dessa metodologia em decorrência da possibilidade de vieses. No presente trabalho, foi utilizada amostragem planejada, com cálculo do número de propriedades e animais a serem amostrados.

A prevalência de 8,1% de animais soropositivos encontrada no presente trabalho levanta preocupação do ponto de vista epidemiológico, uma vez que foram utilizadas cabras adultas, e esses animais são potenciais fontes de infecção para os cabritos, que se infectam principalmente pela ingestão do colostro e/ou leite. Pesquisas anteriores mostraram que a infecção por SRLV ocorre com maior frequência em caprinos com mais de um ano de idade e a prevalência aumenta a partir de três anos em decorrência de transmissão horizontal (Rowe et al. 1992, Greenwood et al. 1995, Blacklaws et al. 2004, Al-Qudah et al. 2006, Kaba et al. 2011).

Na análise univariável para os fatores de risco, as variáveis associadas ($p \leq 0,20$) à prevalência de focos de SRLV foram: tipo de exploração, existência de cercas de boa qualidade, realizar vermifugação dos animais, realizar corte e desinfecção de umbigo, enterrar ou cremar animais mortos e realizar algum exame na compra de animais (Quadro 1). Na análise multivariável, as seguintes variáveis foram associadas com a prevalência de propriedades positivas (Quadro 2): realizar corte e desinfecção de umbigo (*odds ratio*=2,44; $p=0,048$) e existência de cercas de boa qualidade (*odds ratio*=3,45; $p=0,048$). O modelo final apresentou bom ajuste ($\chi^2=1,095$; $p=0,895$).

No presente trabalho, foi observada associação entre prevalência de propriedades positivas e condições de aglomeração de animais, facilitada por cercas de boa qualidade. Isso pode estar relacionado ao fato de que essa condição impede a dispersão de caprinos em determinada área, aumentando a concentração de animais e, conseqüentemente, as chances de transmissão de lentivirus por contato prolongado com secreções de animais infectados (Greenwood et al. 1995, Guedes et al. 2001).

A prática de corte e desinfecção de umbigo também foi associada com a prevalência de propriedades positivas, o que pode estar relacionado com a realização inadequada

Quadro 2. Variáveis associadas com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Lentivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil, determinadas por regressão logística múltipla

Fatores de risco	Odds ratio	IC 95%	p
Realizar corte e desinfecção de umbigo	2,44	1,01 - 5,88	0,048
Condições de aglomeração (cercas de boa qualidade)	3,45	1,01 - 11,76	0,048

Teste de Hosmer e Lemeshow: $\chi^2=1,095$; $p=0,895$.

Quadro 3. Comparação dos testes de AGID, PCR em tempo real das amostras de leucócitos sanguíneos (PCR-sangue) e PCR em tempo real do *pellet* do leite (PCR-leite) com a condição de infecção por *Lentivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba

Testes	Infecção por <i>Lentivirus</i> ^a		Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)	Concordância % (IC 95%)	Kappa (IC 95%)	p
	+	-					
AGID	+	4	4	66,67	90,48	87,50	0,6831
	-	2	38	(22,28 - 95,67)	(77,38 - 97,34)	(74,75 - 95,27)	
qPCR-sangue	+	6	3	100	92,86	93,75	0,2482
	-	0	39	(54,07 - 100)	(80,52 - 98,50)	(82,8 - 98,69)	
qPCR-leite	+	5	6	83,33	85,71	85,42	0,1306
	-	1	36	(35,88 - 99,58)	(71,46 - 94,57)	(72,24 - 93,93)	

^aPositividade em pelo menos dois testes.

desse procedimento, ou seja, sem os devidos cuidados higiênicos, possibilitando a transmissão horizontal do agente por contato com secreções e excreções de animais infectados, principalmente de secreções genitais e sangue de fêmeas parturientes infectadas (East et al. 1993, Rowe & East 1997, Callado et al. 2001, Blacklaws et al. 2004).

Na segunda etapa do trabalho, dos 179 caprinos pesquisados oito animais procedentes de quatro propriedades foram soropositivos. Foi realizada PCR em tempo real dos leucócitos sanguíneos e no *pellet* do leite em 48 fêmeas dessas quatro propriedades. Os resultados da comparação entre as técnicas estão apresentados no Quadro 3. No total, oito, nove e 11 animais foram positivos no AGID, PCR de leucócitos sanguíneos e PCR do leite, respectivamente. Esse resultado indica que houve permanência de animais infectados nos rebanhos, detectados por sorologia e métodos diretos, expondo outros animais ao risco de infecção. Isso é reforçado pelo fato de que as quatro propriedades apresentavam animais com sinais clínicos sugestivos de CAE, como artrite na articulação carpo-metacarpiana, pneumonias e mastite, evidenciados por ocasião da segunda visita.

Considerando como infectados animais com resultados positivos no mínimo em dois testes (Quadro 3), a PCR em tempo real de leucócitos sanguíneos apresentou melhor performance, com sensibilidade de 100%, especificidade de 92,86%, concordância de 93,75% e indicador Kappa de 0,765 (concordância boa). No diagnóstico de lentivirose, deve-se levar em consideração os custos, a viabilidade e as características individuais do teste. No presente trabalho, foi feita associação dos resultados do teste de AGID, o qual é um teste indireto para detecção de anticorpos, com a PCR em tempo real, o qual é um teste direto para detecção de DNA proviral. A PCR em tempo real é capaz de aumentar a eficácia na detecção de animais infectados, pois detecta resultados falsos-negativos no teste de AGID. Além de melhorar a sensibilidade do diagnóstico de SRLV, evidencia o processo virêmico que pode ocorrer em infecções naturais e na ausência de resposta imune humoral detectável pela AGID. Já foi relatada a existência de animais soronegativos no ELISA que foram PCR-positivos (Wagter et al. 1998, Gil et al. 2006). Modolo et al. (2009) detectaram quatro animais positivos na PCR em 34 caprinos soronegativos na AGID, utilizando amostras de sangue heparinizado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a infecção por lentivírus, demonstrada pela detecção de anticorpos e PCR de sangue e leite, está disseminada em rebanhos de caprinos leiteiros do semiárido paraibano. Sugere-se que seja realizado um trabalho de educação sanitária junto aos produtores no sentido de encorajá-los acerca da condução de medidas de prevenção da infecção com o objetivo de reduzir sua disseminação nos rebanhos.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo apoio financeiro. Ao CNPq, pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a S.S. Azevedo e R.S. Castro. À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de Doutorado a M.L.C.R. Silva.

REFERÊNCIAS

- Al-Qudah K., Al-Majali A.M. & Ismail Z.B. 2006. Epidemiological studies on caprine arthritis-encephalitis virus infection in Jordan. *Small Rumin. Res.* 66(1):181-186.
- Bandeira D.A., Castro R.S., Azevedo E.O., Melo L.S.S. & Melo C.B. 2009. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *Vet. J.* 180(3):399-401.
- Batista M.C.S., Castro R.S., Carvalho F.A.A., Cruz M.S.P., Silva S.M.M.S., Rego E.W. & Lopes J.B. 2004. Anticorpos anti-Lentivírus de Pequenos Ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios paraibanos. *Ciênc. Vet. Trop.* 7(2/3):75-81.
- Blacklaws B.A., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Watt N.J., de Andres D., Klein D. & Harkiss G.D. 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101:199-208.
- Brasil 2009. Sistema IBGE de Recuperação Automática, SIDRA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/> Acessado em 30 ago. 2011.
- Brinkhof J.M.A., Houwers D.J., Moll L., Dercksen D. & Van Maanen C. 2010. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* 142:193-198.
- Callado A.K.C., Castro R.S. & Teixeira M.F.S. 2001. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 21(3):87-97.
- Concha-Bermejillo A. 1997. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 13(1):13-33.
- Costa L.S.P., Lima P.P., Callado A.K.C., Nascimento S.A. & Castro R.S. 2007. Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos Santa Inês: isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no Estado de Pernambuco. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 74(1):11-16.
- Donald A.W., Gardner I.A. & Wiggins A.D. 1994. Cut-off points for aggregate

- herd testing in the presence of disease clustering and correlation of test errors. *Prev. Vet. Med.* 19(3/4):167-187.
- East N.E., Rowe J.D., Dahlberg J.E., Theilen G.H. & Pedersen N.C. 1993. Modes of transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Small Rumin. Res.* 10:251-262.
- Fernandes M.A., Araújo W.P. & Castro R.S. 2003. Prevalência da infecção pelo vírus Maedi-Visna em ovinos da microrregião grande São Paulo. *Ciênc. Vet. Trop.* 6(1):23-28.
- Gil A., Rola M. & Kuzmak J. 2006. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol. J. Vet. Sci.* 9:213-217.
- Greenwood P.L., North R.N. & Kirkland P.D. 1995. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust. Vet. J.* 72:341-345.
- Greenwood P.L. 1995. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22:71-87.
- Guedes M.I.M.C., Souza J.C.A. & Gouveia A.M.G. 2001. Caprine arthritis encephalitis vírus experimental infection in newborn kids. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53(1):15-20.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Jordan D. 1996. Aggregate testing for the evaluation of Johne's disease herd status. *Aust. Vet. J.* 73(1):16-19.
- Kaba J., Nowicki M., Sobczak-Filipiak M., Witkowski L., Nowicka D., Czopowicz M., Szaluś-Jordanow O. & Bagnicka E. 2011. Case-control studies on the occurrence of the neurologic form of caprine arthritis-encephalitis in Poland. *Medycyna Wet.* 67(4):263-266.
- Karanikolaou K., Angelopoulou K., Papanastasopoulou M., Koumpati-Artopiou M., Papadopoulos O. & Kopotopoulos G. 2005. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin. Res.* 58(2):181-187.
- Leginagoikoa I., Minguijón E., Berriatua E. & Juste R.A. 2009. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J. Virol. Methods* 156(1-2):145-149.
- Lilenbaum W., Souza G.N., Ristow P., Moreira M.C., Fráguas S., Cardoso V.S. & Oelemann W.M.R. 2007. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro. *Braz. Vet. J.* 173(2):408-412.
- Mackinnon A. 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.* 30(3):127-134.
- Modolo J.R., Stachissini A.V.M., Padovani C.R., Araujo Júnior J.P., Castro R.S., Ravazzolo A.P. & Leite B.L.S. 2009. PCR associated with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Rumin. Res.* 81:18-20.
- Moojen V., Soares H.C., Ravazzolo A.P., Pizzol M. & Gomes M. 1986. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 1:77-78.
- OIE 2008. *Caprine arthritis-encephalitis & maedi-visna. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, World Organization for Animal Health. Disponível em <<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>> Acessado em 9 fev. 2011.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G. & Alves F.S.F. 2001. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural* 31(3):449-454.
- Rimstad E., East N.E., Torten M., Higin J., Derock E. & Pedersen N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54(11):1858-1862.
- Rowe J.D., East N.E., Thurmond M.C., Franti C.E. & Pedersen N.C., 1992. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.* 53(12):2386-2395.
- Rowe J.D. & East N.E. 1997. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13(1):35-53.
- Silva J.S., Castro R.S., Melo C.B. & Feijó F.M.C. 2005. Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57:726-731.
- Thrusfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*. 3rd ed. Blackwell Science, Oxford.
- Valas S., Benoit C., Baudry C., Perrin G. & Mamoun R.Z. 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J. Virol.* 74(13):6178-85.
- Wagter L.H., Jansen A., Bleumink-Pluym N.M., Lenstra J.A. & Houwers D.J. 1998. PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Commun.* 22(5):355-62.