

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE AGENTES
VIRAIS EM CAPRINOS LEITEIROS DO SEMIÁRIDO
DA PARAÍBA, NORDESTE DO BRASIL**

MARIA LUANA CRISTINY RODRIGUES SILVA

PATOS-PB

2012



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Campus de Patos - PB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE AGENTES VIRAIS EM CAPRINOS LEITEIROS DO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA, NORDESTE DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

MARIA LUANA CRISTINY RODRIGUES SILVA

Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Orientador

PATOS-PB

2012

FICHA CATALOGRÁFICA
De acordo com AACR2, CDU, CUTTER
Biblioteca Setorial do CSTR/UFCG – Campus de Patos - PB

S586c
2012

Silva, Maria Luana Cristiny Rodrigues

Caracterização epidemiológica de agentes virais em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil / Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva. – Patos-PB: CSTR/UFCG, 2012.

121 f. il.

Orientador: Sérgio Santos de Azevedo
Tese (Doutorado em Medicina Veterinária),
Universidade Federal de Campina Grande. Centro de
Saúde e Tecnologia Rural. Programa de Pós-Graduação
em Medicina.

1 – Epidemiologia. 2 – Lentivirus de pequenos
ruminantes. 3 - Língua azul. 4 – Herpesvirus. I – Título.

CDU:616-036.22:619

Nome: SILVA, Maria Luana Cristiny Rodrigues

Título: Caracterização epidemiológica de agentes virais em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Apresentada em : ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos-PB

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa

Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos-PB

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos-PB

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns-PE

Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto

Universidade Federal Rural do Semiárido - Mossoró-RN

“**A** flexibilidade e adaptabilidade são características que todos devemos procurar. E não há gigantes. Alguns grupos de estímulos estressantes não nos afetam tanto, outros nos fazem claudicar. O nosso EU deveria ser sempre uma “construção” inacabada. Humildade não é sinal de fragilidade, mas sim um raciocínio de alta complexidade e multifocalidade, uma grande couraça de um EU experiente”.(CURY, 2011).

Dedicatória

***A** Deus, e a todos que contribuíram para essa oportunidade.*

AGRADECIMENTO

gradeço primeiramente a Deus por sempre está comigo em todas as horas, abençoando este momento de vitória e satisfação, e pela luz que clareia meu caminho, pois nem a altura, nem a profundidade, nem alguma criatura poderá me separar do amor de Deus.

A meus pais João Figueiredo (In memorial) e Salete Rodrigues por sempre mostrarem o caminho da honestidade, dignidade, seriedade, companheirismo e amor que nasce na simplicidade do nascer do sol. A minha irmã Layssa Ryama, meu cunhado Romero Barros e meus sobrinhos Lucas Ryan e Luan Romero pela compressão e amor a todo instante. Aos meus familiares que sempre estiveram presente em minha vida, apoiando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFCG/CSTR pela oportunidade.

Gostaria de demonstrar um sincero agradecimento ao Dr. Sérgio Santos pela orientação, confiança e oportunidade.

Ao Laboratório de Vírus de Bovídeos pela parceria e ensinamentos para a realização deste trabalho, representado pela Dra. Edvirgens Maristela Pituco e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Vírus Da UFRPE, pela parceria e ensinamentos para a realização deste trabalho, representado pela Dr. Roberto Soares Castro e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

A amiga Carolina Américo ao constante apoio, amizade e força pela realização do meu trabalho.

Aos amigos do CSTR/UFCG.

Aos proprietários dos caprinos pela confiança e oportunidade.

Ao CAPES pela bolsa concedida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar indicadores epidemiológicos para infecções virais em caprinos leiteiros no semiárido da Paraíba. Foram determinadas as prevalências de propriedades positivas (focos) e de animais soropositivos, bem como foram identificados fatores de risco associados às infecções por *Herpesvírus caprino 1* (CpHV-1), *Pestivirus*, vírus da Língua Azul (LA) e lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). No total, foram amostradas de 1.034 a 1.092 fêmeas caprinas adultas procedentes de 110 propriedades leiteiras localizadas no Município de Monteiro, microrregião do Cariri Ocidental, Estado da Paraíba, no período de novembro de 2009 a agosto de 2011. Para cada doença, foi realizado o diagnóstico sorológico com técnicas consolidadas internacionalmente. Para LVPR, foi procedida a detecção direta do agente por PCR em tempo real de sangue e leite. Uma propriedade foi considerada foco quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. As prevalências de propriedades positivas foram de 89,1%, 6,36%, 59,1% e 44,6% para as infecções por CpHV-1, *Pestivirus*, vírus da LA e LVPR, respectivamente. As prevalências de animais soropositivos foram de 36,6%, 0,82%, 12,1% e 8,1%, respectivamente. A utilização da monta natural foi identificada como fator de risco associado à prevalência de rebanhos positivos para CpHV-1; para *Pestivirus*, não realizar vermifugação e realizar corte e desinfecção de umbigo foram identificados como fatores de risco; produção diária de leite superior a 19 litros foi identificada como fator de risco para LA; para LVPR, realizar corte e desinfecção de umbigo e existência de cercas de boa qualidade foram identificados como fatores de risco, e a PCR em tempo real da série branca do sangue apresentou boa performance, com sensibilidade de 100%, especificidade de 92,86%, concordância de 93,75% e indicador Kappa de 0,765. Com base na análise de fatores de risco, foi possível a recomendação de medidas e intervenções com vistas à minimização de perdas econômicas.

Palavras-chave: pequenos ruminantes, infecções virais, sorologia, PCR, epidemiologia (controle)

ABSTRACT

The aim of this survey was to determine epidemiological indicators to viral infections in dairy goats in the semiarid region of the Paraíba State. It was determined the prevalence of positive flocks (foci) and seropositive animals, as well as risk factors associated with the infections due to caprine herpesvirus 1 (CpHV-1), *Pestivirus*, bluetobgue virus (BTV) and small ruminants lentivirus (SRLV) were identified. From 1,034 to 1,092 dairy goats were sampled in 110 dairy flocks in the county of Monteiro, Cariri Ocidental microregion, Paraíba State, during November 2009 to August 2011. To each disease the serological diagnosis was carried-out using internationally consolidated techniques. For SRLV the direct detection of the agent was performed by real-time PCR in blood and milk. A flock was considered positive when presented at least one seropositive animal. Prevalences of positive flocks were 89.1%, 6.36%, 59.1% and 44.6% for the infections by CpHV-1, *Pestivirus*, BTV and SRLV, respectively. Prevalences of seropositive animals were 36.6%, 0.82%, 12.1% and 8.1%, respectively. The use of natural mating was identified as a risk factor associated with CpHV-1 flock-level prevalence; for *Pestivirus*, not perform vermifugation and to perform umbilical cord cutting and disinfection were identified as risk factors; daily milk production upper to 19 liters was identified as risk factor to LA; for SRLV, umbilical cord cutting and disinfection and existence of good quality fences were identified as risk factors, and 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. Based on the risk factor analysis it was possible to recommend measures and interventions aiming the minimization of economic losses.

Key words: small ruminants, viral infections, serologia, PCR, epidemiology (control)

Sumário

Introdução.....	10
Referências	11
CAPÍTULO I	
Evidência sorológica e fatores de risco associados com herpesvirus caprino 1 (CpHV-1) em caprinos leiteiros na região semiárida no Nordeste do Brasil	
Resumo	14
Referências	21
CAPÍTULO II	
Prevalência de anticorpos anti-pestivírus e fatores de risco em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil	
Resumo	29
Abstract	30
Introdução.....	30
Material e Métodos	32
Resultados e discussão	35
Referências	38
CAPÍTULO III	
Prevalência e fatores de risco para a língua azul em propriedades de caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil	
Resumo	50
Abstract	51
Introdução.....	51
Material e Métodos	53
Resultados e discussão	56
Conclusões.....	60
Referências	61
CAPÍTULO IV	
Lentivirus em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil	
Abstract	66
Resumo	67

Introdução.....	67
Material e Métodos	68
Resultados e discussão	71
Conclusões.....	73
Referências	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
ANEXOS	83

Lista de Tabelas e Quadros

CAPÍTULO I

Evidência sorológica e fatores de risco associados com herpesvirus caprino 1 (CpHV-1) em caprinos leiteiros na região semiárida no Nordeste do Brasil

Tabela 1. Prevalência intra-rebanho para <i>Pestivirus</i> em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010	24
Tabela 2. Análise univariada com as variáveis relacionadas às características das propriedades em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.....	25

CAPÍTULO II

Prevalência de anticorpos anti-pestivirus e fatores de risco em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Tabela 1. Prevalência intra-rebanho para <i>Pestivirus</i> em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010	43
Tabela 2. Análise univariada com as variáveis relacionadas às características das propriedades em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.....	44
Tabela 3. Análise univariada com as variáveis relacionadas aos sinais clínicos em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.	46
Tabela 4. Fator de risco para a ocorrência de propriedades positivas para <i>Pestivirus</i> em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.....	48

CAPÍTULO III

Prevalência e fatores de risco para a língua azul em propriedades de caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Tabela 1. Análise univariada para os fatores de risco com as variáveis mais associadas ($p \leq 0,20$) com a ocorrência de propriedades positivas para o vírus da língua azul em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010.....	57
--	----

Tabela 2. Fator de risco para a ocorrência de propriedades positivas para o vírus da língua azul em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010....59

CAPÍTULO IV

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

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 Brasil76

Quadro 2. Fatores de risco com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Lentivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil.78

Quadro 3. Comparação dos testes de IDGA, PCR em tempo real da série branca do sangue (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.....79

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade em plena ascensão no Brasil e de grande importância, visto que os caprinos são importantes fontes de carne e leite para os seres humanos, principalmente na região Nordeste, que detém o maior efetivo caprino do país, em torno de 94%. Nesse contexto, o estudo de agentes infecciosos que podem ter impacto negativo nesta exploração assume importância. A condução de investigações epidemiológicas baseadas em amostragem planejada permite o levantamento de informações essenciais para o controle e prevenção de doenças infecciosas, incluindo a determinação da prevalência de animais soropositivos e propriedades-foco, bem como a identificação de fatores de risco.

Dentre os agentes infecciosos para caprinos, o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), vírus da língua azul (BTV), *Pestivirus* e os lentivírus de pequenos ruminantes assumem importância por causarem perdas diretas e indiretas para a caprinocultura. O CpHV-1 em caprinos adultos cursa com infecções subclínicas, problemas reprodutivos, respiratórios, gastrintestinais, infecções generalizadas e mortalidade perinatal em cabritos (Uzal et al. 2004; Roperto et al. 2000; Van der Lugt & Randles 1993). O BoHV-1 provoca doença respiratória, genital e abortamentos. O BTV pode apresenta-se de forma clínica branda a severa, causando diminuição na produção de leite e carne, diminuição do período de lactação, abortamentos e nascimento de animais fracos (Breard et al. 2004; Aradaib et al. 2005). Os *Pestivirus* também são responsáveis por problemas reprodutivos, principalmente abortamentos (BROCK et al. 2005). Os lentivírus comprometem os sistemas articular, reprodutivo, respiratório, mamário e nervoso, apresentando evolução lenta, degenerativa e crônica, com sintomatologia variável (CALLADO et al. 2001).

Nesta tese, seguindo a normativa do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), são apresentados quatro capítulos. O primeiro capítulo é um artigo acerca de estudo epidemiológico com a determinação de prevalências e fatores de risco para o CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 em caprinos leiteiros do Município de Monteiro, semiárido da Paraíba, e submetido ao periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. No segundo e no terceiro capítulos são apresentados dois artigos referentes a estudos epidemiológicos em caprinos leiteiros da mesma região para *Pestivirus* e vírus da Língua Azul, e submetidos aos periódicos *Semina: Ciências Agrárias* e *Arquivo*

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, respectivamente. No quarto capítulo é abordada investigação epidemiológica para lentivirus de pequenos ruminantes em caprinos leiteiros da mesma região, incluindo a determinação de prevalência e fatores de risco, e pesquisa direta do agente e submetido ao periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

REFERÊNCIAS

- ARADAIB I.E. et al. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, v.111, n.3-4, p.145-150, 2005.
- BREARD E. et al. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res. Vet. Sci.*, v.77, n.1, p.1-8, 2004.
- BROCK, K. V. et al. Reproductive Diseases and Persistent Infections. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.). Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management, and control. Iowa: Blackwell, 2005. p. 145-156.
- CALLADO A.K.C. et al. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.
- ROPERTO F. et al. 2000. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. *J. Comp. Pathol.* 122: 298–302.
- UZAL F.A. et al. 2004. Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:478–484.
- VAN DER LUGT J.J. & RANGLES J.L. 1993. Systemic herpesvirus infection in neonatal goats. *J.S.Afr.Vet.Ass.* 64:169–171.

Capítulo I

Evidência sorológica e fatores de risco associados com o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1) em caprinos leiteiros na região semiárida do Nordeste do Brasil

Artigo publicado no periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

**Evidência sorológica e fatores de risco associados com o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1)
em caprinos leiteiros na região semiárida do Nordeste do Brasil**

Maria L. C. R. Silva, Edviges M. Pituco, Adriana H.C. Nogueira, Maira S.N. Martins, Michele S.
Lima, Sérgio S. Azevedo

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, Patos, Paraíba,
Brasil (Silva, Azevedo) e the Laboratório de Viroses de Bovinos, Instituto Biológico, São Paulo,
Brasil (Pituco, Nogueira, Martins, Lima).

¹Autor para correspondência: Sérgio Santos de Azevedo, Universidade Federal de
Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-970 Patos, Paraíba, Brasil.
sergio.azevedo@pq.cnpq.br

Resumo. Um estudo transversal foi realizado para determinar a soroprevalência em nível de rebanho para o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1) e herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e 2 (BoHV-2), e fatores de risco associados com CpHV-1 em rebanhos de caprinos leiteiros de uma região semiárida do Nordeste do Brasil. Foram colhidas 1,034 amostras de soro de 110 rebanhos de março de 2009 a março de 2010. Em cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico estruturado com o intuito de obter informações acerca de variáveis relacionadas a fatores de risco para a infecção por CpHV-1. Para a detecção de anticorpos anti-CpHV-1, anti-BoHV-1 e anti-BoHV-2 foram utilizados testes de neutralização. As prevalências de rebanhos positivos para CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 foram 89,1% (98/110; IC 95%: 81,7-94,2), 80% (88/110; IC 95%: 71,3-87) e 4,5% (5/110; IC 95%: 1,5-10,3), respectivamente. As frequências de animais soropositivos foram de 36,6% (379/1.034), 25,8% (267/1.034) e 0,6% (6/1.034) para CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2, respectivamente. A utilização da monta natural foi identificada como fator de risco associado à prevalência de rebanhos positivos para CpHV-1 ($P = 0,001$). Sugere-se o encorajamento da adoção de serviços veterinários e de programa de vigilância ativa dos rebanhos em risco na região de estudo com o objetivo de reduzir a prevalência dessas infecções.

Palavras-chaves: Brasil; fatores de risco; herpesvírus; pequenos ruminantes.

Os herpesvírus estão amplamente distribuídos na natureza, causando infecções inaparentes ou latentes. O herpesvírus caprino 1 (CpHV-1) está relacionado antigenicamente e geneticamente com o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e herpesvírus bovino 2 (BoHV-2).¹⁸

A transmissão do CpHV-1 nos rebanhos caprinos é favorecida principalmente pela monta natural, devido ao tropismo seletivo do agente pelo trato genital, a latência nos gânglios sacrais e

reativação da infecção latente, coincidente com o estro.⁸ A transmissão do BoHV-1 ocorre pelo contato direto e indireto entre animais, uma vez que o vírus é disseminado através de secreções respiratórias, oculares e genitais durante a infecção aguda, enquanto que o BoHV-2 é provavelmente transmitido por contato direto ou indireto através de fluidos vesiculares e crostas contaminadas.¹²

O CpHV-1 em caprinos adultos cursa com infecções subclínicas¹⁶, podendo induzir a vulvovaginite¹⁴, balanopostite ou postite ulcerativa²¹, doenças respiratórias², abortos espontâneos^{6, 11, 21}, enterite neonatal, infecções generalizadas e mortalidade perinatal em cabritos.^{10, 16, 22} Descarga nasal, dispneia, adenites e diarreia foram relatados em caprinos experimentalmente infectados com BoHV-1.¹⁷ Em relação ao BoHV-2, não há relato de sinais clínicos da infecção em caprinos.

No Brasil, há poucos trabalhos sobre a prevalência de CpHV-1 e BoHV-1 em pequenos ruminantes. No Estado de São Paulo, frequência de 16% (8/51) foi relatada em caprinos e 17% (17/100) em ovinos para CpHV-1.¹³ Em caprinos no Estado de Pernambuco foram identificados anticorpos anti-BoHV-1 em 6,8% (14/206) dos animais.⁵ Nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, anticorpo anti-BoHV-1 foram relatados em 62% (209/337) dos caprinos testados.¹ No entanto, nestes trabalhos, poucos rebanhos e animais foram examinados, e não houve cálculos de amostragem. A infecção pelo BoHV-2 nunca foi investigada em caprinos no Brasil.

Os caprinos são economicamente importantes em muitos países, incluindo o Brasil, onde esta espécie representa importante fonte de carne e leite para os seres humanos, particularmente na região Nordeste, na qual 93,7% dos caprinos estão concentrados.³ O Estado da Paraíba, localizado na região Nordeste do Brasil, é caracterizado por um clima quente durante todo o ano. O Município de Monteiro, localizado na região do Cariri paraibano, destaca-se na produção de leite de cabra na Paraíba e no Brasil, e tem o maior efetivo de caprinos do Estado, com 30.240 animais.³ O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de rebanhos positivos para as

infecções por CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 e identificar os fatores de risco associados com a infecção por CpHV-1 em rebanhos de caprinos leiteiros do Nordeste do Brasil, utilizando uma amostragem planejada.

O presente estudo foi realizado de março de 2009 a março de 2010, no Município de Monteiro (7°53'S, 37°5'W), microrregião do Cariri Ocidental, região semiárida do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. O clima é semiárido, e a temperatura varia de 18 °C durante a noite a 31 °C durante o dia, com temperatura média de 22 °C. A altitude é de 599 metros acima do nível do mar.

O trabalho foi delineado como estudo transversal em rebanhos de caprinos leiteiros selecionados aleatoriamente. Amostras de sangue foram colhidas de cabras com idade ≥ 12 meses. O número de propriedades a serem utilizadas foi determinado considerando o número de propriedades de caprinos leiteiros da região ($n = 180$, de acordo com os dados do Centro de Desenvolvimento Integrado da Caprinovinocultura, Estado da Paraíba), com prevalência esperada de rebanhos positivos de 50% (valor adotado para maximizar a amostra e levando-se em consideração que não se conhece a prevalência na região), e precisão desejada de 10%, para um nível de confiança de 99%²⁰, resultando em 86 propriedades a serem visitadas. Em seguida, O número de animais a serem selecionados foi calculado por rebanho, de modo a detectar a presença de infecção. Os cálculos foram feitos de acordo com a fórmula amplamente aplicada em investigações epidemiológicas.²⁰

$$n = \left[1 - (1 - p)^{\frac{1}{d}} \right] \times \left(N - \frac{d}{2} \right) + 1$$

onde:

n – tamanho da amostra

p – probabilidade de detecção de pelo menos um caprino soropositivo

N – tamanho do rebanho

d – número de caprinos soropositivos no rebanho

A probabilidade de detecção de pelo menos uma cabra soropositiva num rebanho foi determinada a 95% ($p = 0,95$), e o número de cabras soropositivos em cada rebanho (d) foi calculada assumindo a prevalência intra-rebanho de 6,8% para BoHV-1.⁵ A seleção de caprinos em cada propriedade foi realizada por amostragem aleatória sistemática.

No total 1,034 cabras de 110 propriedades selecionados aleatoriamente foram examinados para a pesquisa de anticorpo anti-CpHV-1, anti-BoHV-1 e anti-BOHV-2.

Todas as amostras de soro foram inativadas a 56° C durante 30 min e, em seguida, analisadas por testes de neutralização. Os testes foram realizados em placas de 96 poços de microtitulação^a. As capacidades de neutralização de cada soro foram testadas com a cepa VR 262^b do CpHV-1, cepa Los Angeles^c do BoHV-1 e uma cepa de BoHV-2^d. Um volume de 50 uL de diluição seriada em duplicata, a partir de 1:2 (1:4 para CpHV-1) de soro inativado foi misturado em placas de microtitulação com 50 µL de aproximadamente 200TCID₅₀/50 µL de cada cepa e incubadas por duas horas (CpHV-1 e BoHV-2) e 24 horas (BoHV-1) a 37 °C, em estufa umidificada a 5% de CO₂. 100 µL (50 µL para CpHV-1) de uma suspensão de células MDBK^e na concentração de 3 x 10⁵ células/mL foram adicionados por cavidade da placa para BoHV-1 e BoHV-2. Após 96 horas de incubação a 37 ° C em estufa umidificada a 5% de CO₂, as placas foram visualizadas utilizando um microscópio invertido. Todos os soros foram testados em 2-4 cavidades. Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou título ≥ 2 para BoHV-1 e BoHV-2, e ≥ 4 para CpHV-1. Os títulos infecciosos utilizados foram 10⁶TCID₅₀/50

μL para CpHV-1, $10^{5,14}\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ para BoHV-1 e $10^{5,6}\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ para BoHV-2, calculados de acordo com Reed e Muench.¹⁵

Um questionário epidemiológico foi aplicado por propriedade com o objetivo de obter informações de possíveis fatores de risco. Foram colhidas informações acerca de 17 variáveis em nível de rebanho: tipo de manejo, sistema de produção, tamanho do rebanho, presença de bovinos, disponibilidade de serviços veterinários, compra de animais, venda de animais, uso de piquetes para procedimentos sanitários, monta natural, inseminação artificial, uso de pasto comum, uso de piquetes de parição, e histórico de abortamentos, corrimento vaginal, infertilidade, nascimento de animais fracos e morte ao desmame.

Propriedades que apresentaram pelo menos um animal soropositivo foram consideradas positivas. A prevalência de rebanhos positivos foi estimada a partir da razão de rebanhos positivos para o número total de rebanhos investigados, com intervalo de confiança de 95%²⁰, utilizando o programa EpiInfo versão 6.04. A análise de fatores de risco foi realizada em duas etapas: análises univariável e multivariável. A análise univariável foi realizada utilizando o teste de qui-quadrado ou exato de Fisher²⁴, e as variáveis que apresentaram $P < 0,20$ foram utilizadas na regressão logística múltipla.⁹ O nível de significância na análise multivariável foi de 5%. As análises foram realizadas com o programa *SPSS for Windows*, versão 13.0.

As prevalências de propriedades positivas para CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 foram 89,1% (98/110; IC 95%: 81,7-94,2), 80% (88/110; IC 95%: 71,3-87) e 4,5% (5/110; IC 95%: 1,5-10,3), respectivamente. As frequências de animais soropositivos foram de 36,6% (379/1.034), 25,8% (267/1.034) e 0,6% (6/1.034) para CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2, respectivamente.

Todos animais soropositivos para BoHV-2 também foram soropositivos para BoHV-1 e CpHV-1, e todos os animais soropositivos para BoHV-1 também foram soropositivos para

CpHV-1. A maioria dos animais foram positivos em títulos de 256, 16 e 4 para o anti-CpHV-1, anti-BoHV-1 e anti-BoHV-2, respectivamente (Tabela 1). Cento e nove animais (10,5%) apresentaram títulos de anticorpos apenas para CpHV-1.

O uso de monta natural foi identificado como fator de risco ($P = 0,001$) associado com a prevalência de rebanhos positivos para CpHV-1 (Tabela 2). Uma vez que apenas essa variável foi associada com a prevalência de rebanhos positivos para CpHV-1, a análise multivariável não foi realizada.

Este é o primeiro estudo acerca da soroprevalência e dos fatores de risco associados para as infecções por CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 realizados no Brasil utilizando amostragem planejada. A alta prevalência de propriedades positivas para CpHV-1 (89,1%) e BoHV-1 (80,0%) sugere disseminação desses agentes na área de estudo, e está de acordo com os resultados encontrados em outros países, tais como na França.¹⁹

Sabe-se que propriedades localizadas em áreas mais frias são mais propensas a apresentarem infecções por herpesvírus.^{4, 23} A alta prevalência de rebanhos positivos encontrada neste estudo para CpHV-1 (89,1%) e BoHV-1 (80,0%) causa surpresa, uma vez que o clima na região é quente (a temperatura é de cerca de 31 °C durante o dia). No entanto, condições de temperatura e umidade elevadas podem causar estresse térmico nos animais, diminuindo a resposta imune e, conseqüentemente, predispondo os animais à infecções.⁴

No Nordeste do Brasil, a infecção natural por BoHV-1 em caprinos pode ter implicações mais sérias no que se refere à erradicação, uma vez que os rebanhos de caprinos são grandes em muitas áreas, a densidade de animais em muitos rebanhos é muito alta, favorecendo o contato entre animais e a transmissão de vírus, e os caprinos são criados em contato direto com bovinos,

compartilhando pastagens, água, alimentos e instalações.^{7, 17} Assim, obviamente que esta situação favorece o contato e pode facilitar a transmissão do vírus entre as espécies.⁷

Verificou-se que a monta natural foi associada com a maior prevalência de rebanhos positivos para CpHV-1. Uma das principais vias de eliminação do CpHV-1 é o sêmen, de modo que a monta natural representa maior probabilidade de infecção.

Os resultados do presente trabalho mostraram evidências da presença de CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 em caprinos de uma região semiárida do Nordeste do Brasil, usando-se amostragem planejada, bem como o procedimento de monta natural foi associado com o aumento da prevalência de propriedades positivas para CpHV-1. Sugere-se um encorajamento da adoção de serviços veterinários e de programa de vigilância ativa dos rebanhos em risco na região com o objetivo de reduzir a prevalência dessas infecções.

Agradecimento

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 503425/2009-5. Ao CNPq, pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a S.S. Azevedo, e à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de Doutorado a M.L.C.R. Silva.

^a Flat bottom plates TPP 92096, Made in Europe, Switzerland.

^b American Type Culture Collection, Manassas, VA.

^c American Type Culture Collection, Manassas, VA.

^d Robert Koch Institute, Berlin, Germany.

^e American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Referências

1. Alexandrino BA, Borges LA, Dias FC, et al.: 2011. Evaluation of the presence of antibodies against BoHV-1 in goats. *Virus Rev. Res.* 16: 292-293.
2. Berrios PE, McKercher DG, Knight HD. 1975. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1755-1762.
3. Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, SIDRA, 2009. Available from <www.sidra.ibge.gov.br/bda/>.
4. Carbonero A, Saa LR, Jara DV, et al.: 2011. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Prev. Vet. Med.* 100: 84–88.
5. Castro RS, Silva FAG, Frutuoso EM, et al.: 1994. Anticorpos contra pestivirus e herpesvirus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 46, 577-578. [Antibodies against pestivirus and herpesvirus in dairy goats in Pernambuco State, Brazil]. In Portuguese. Abstract in English.
6. Chénier S, Montpetit C, Hélie P, 2004. Caprine herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec. *Can. Vet. J.* 45: 241-243.
7. Diel DG, Almeida SR, Brum MCS, et al.: 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 121: 257–267.
8. Franco AC, Roehe PM, 2007. Herpesviridae, In: Flores, E.F. (Ed.), *Virologia veterinária*. UFSM, Santa Maria, pp. 433-488.

9. Hosmer DW, Lemeshow S. (Eds.), 2000. Applied logistic regression. John Wiley & Sons, New York, 375 pp.
10. Koptopoulos G, 1992. Goat herpesvirus 1 infection: a review. *Vet. Bull.* 62:77–84.
11. Moeller Jr RB, 2001. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991–1998). *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 265–270.
12. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, et al.: 1999, *Veterinary virology*. 3. ed. San Diego: Academic Press. Pp. 301-326.
13. Nogueira AHC, Okuda LH, De Stefano E, et al.: 2010. Detection of caprine herpesvirus (CpHV-1) in small ruminants in the Sorocaba region, São Paulo, Brazil. *Virus Res.* 15: 151-152.
14. Piper KL, Fitzgerald CJ, Ficorilli N, et al.: 2008. Isolation of caprine herpesvirus 1 from a major outbreak of infectious pustular vulvovaginitis in goats. *Aust. Vet. J.* 86: 136–138.
15. Reed LJ, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
16. Roperto F, Pratelli A, Guarino G, et al.: 2000. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. *J. Comp. Pathol.* 122: 298–302.
17. Six A, Banks M, Engels M., et al.: 2001. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Arch. Virol.* 146: 1325–1335.
18. Thiry J, Keuser V, Muylkens B, et al.: 2006. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37: 169–190.
19. Thiry J, Saegerman C, Chartier C, et al.: 2008. Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *Vet. Microbiol.* 128: 261-268.
20. Thrusfield M, 2007. *Veterinary epidemiology*. third ed. Blackwell Science, Oxford.

21. Uzal FA, Woods L, Stillian M, et al.: 2004. Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 478–484.
22. Van der Lugt JJ, Randles JL, 1993. Systemic herpesvirus infection in neonatal goats. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 64: 169–171.
23. Woodbine KA, Medley GF, Moore SJ, et al.: 2009. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. *BMC Vet. Res.* 5: 1-12.
24. Zar J H, 1999. *Biostatistical analysis*, fourth ed. Upper Saddle River, Prentice Hall.

Tabela 1. Número e frequência de animais soropositivos para CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2 em caprinos leiteiros do município de Monteiro, região semiárida do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, de março de 2009 a março de 2010, de acordo com os títulos de anticorpos neutralizantes.

Títulos de anticorpos neutralizantes	CpHV-1	Apenas anti-CpHV-1	BoHV-1	BoHV-2
2	NR ^a	NR ^a	38 (14,2)	2 (33,3)
4	45 (11,9)	30 (27,5)	54 (20,2)	3 (50)
8	14 (3,7)	10 (9,2)	52 (19,5)	
16	21 (5,5)	13 (11,9)	61 (22,8)	1 (16,7)
32	25 (6,6)	10 (9,2)	31 (11,7)	
64	41 (10,8)	8 (7,3)	16 (6)	
128	67 (17,7)	16 (14,7)	7 (2,7)	
256	107 (28,3)	16 (14,7)	5 (1,9)	
512	59 (15,6)	6 (5,5)	1 (0,4)	
1024	NR ^a	NR ^a	2 (0,8)	
Total	379 (36,6)	109	267 (25,8)	6 (0,6)

^a NR: Não realizado

Tabela 2. Fatores de risco para a infecção por CpHV-1 em rebanhos de caprinos leiteiros no Município de Monteiro, região semiárida do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, de março de 2009 a março de 2010.

Variáveis	Categoria	Nº. de rebanhos	No. de rebanhos positivos (%)	Odds ratio (IC 95%)	P
Tipo de manejo	Semi-intensivo	101	89 (88,1)	1	
	Intensivo	2	2 (100)	*	1,000
	Extensivo	7	7(100)	*	1,000
Sistema de produção	Subsistência	6	5 (83,3)	1	
	Recria/engorda	7	6 (85,7)	1.20 (0,01; 109,70)	1,000
	Cria	92	82 (89,1)	1.64 (0,03; 16,93)	0,520
	Reprodução	5	5 (100)	*	1,000
Tamanho do rebanho	1 - 15 caprinos	27	23 (85,2)	1	
	16 - 43 caprinos	56	51 (91,1)	1.77 (0,36; 8,63)	0,463
	> 43 caprinos	27	24 (88,9)	1.39 (0,23; 9,01)	1,000
Presença de bovinos	Não	35	31 (88,6)	1	
	Sim	75	67 (89,3)	1.08 (0,25; 4,39)	1,000
Disponibilidade de serviços veterinários	Não	6	4 (83,3)	1	
	Sim	104	93 (89,4)	4.23 (0,47; 32,34)	0,147
Compra de animais	Não	75	66 (88)	1	
	Sim	35	32 (91,4)	1.45 (0,33; 7,32)	0,749
Venda de animais	Não	59	52 (88,1)	1	

	Sim	51	46 (90,2)	1.24 (0,32; 4,89)
Uso de piquetes para procedimentos sanitários	Não	79	70 (88,6)	1
	Sim	31	28 (90,3)	1.20 (0,27; 6,08)
Monta natural	Não	3	0 (0)	1
	Sim	107	98 (91,6)	*
Inseminação artificial	Não	67	59 (88,1)	1
	Sim	43	39 (90,7)	1,32 (0,33; 5,66)
Uso de pastos comuns	Não	97	86 (88,7)	1
	Sim	13	12 (92,3)	1,53 (0,17; 34,58)
Uso de piquetes de parição	Não	101	89 (88,1)	1
	Sim	9	9 (100)	*
Histórico de abortamento	Não	51	44 (86,3)	1
	Sim	59	54 (91,5)	1,72 (0,45; 6,79)
Histórico de corrimento vaginal	Não	104	92 (88,5)	1
	Sim	6	6 (100)	*
Histórico de infertilidade	Não	101	89 (88,1)	1
	Sim	9	9 (100)	*
Histórico de nascimentos de animais fracos	Não	26	22 (84,6)	1
	Sim	84	76 (90,5)	1,73 (0,39; 7,21)

Histórico de morte ao desmame	Não	97	86 (88,7)	1
	Sim	13	12 (92,3)	1,53 (0,17; 34,5)

*Não foi possível calcular a *odds ratio* porque um dos valores foi igual a zero

Capítulo II

Prevalência de anticorpos anti-pestivírus e fatores de risco em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Artigo enviado para publicação no periódico *Semina: Ciências Agrárias* de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Prevalência de anticorpos anti-pestivírus e fatores de risco em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Prevalence of anti-pestivirus antibodies and risk factors in dairy goats from the semiarid region of Paraíba State, Northeastern Brazil

Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva¹; Edviges Maristela Pituco²; Adriana Hellmeister de Campos Nogueira³; Michele dos Santos Lima⁴; Maira de Souza Nunes Martins⁵; Carolina de Sousa Américo Batista Santos⁶; Sérgio Santos de Azevedo^{2*}

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-pestivírus em caprinos leiteiros do semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, bem como identificar fatores de risco associados à prevalência de rebanhos positivos. Foram utilizados 1.092 cabras leiteiras de 110 propriedades selecionadas aleatoriamente no Município de Monteiro, Estado da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010. Em cada propriedade selecionada foi aplicado questionário epidemiológico para verificar a ocorrência de possíveis fatores associados à ocorrência da infecção. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Pestivirus*, foi utilizada a prova de soroneutralização com a estirpe de BVDV-1 NADL. A prevalência de propriedades

¹Discente da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Patos, PB. E-mail: luacristiny@yahoo.com.br

² Pesquisadora do Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico, São Paulo, SP: E-mail: pituco@biologico.sp.gov.br

³ Pesquisadora do Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico, São Paulo, SP: E-mail: adriananogueira@biologico.sp.gov.br

⁴ Pós-graduanda do Instituto Biológico, São Paulo, SP: E-mail: michele_slima@yahoo.com.br

⁵ Pós-graduanda do Instituto Biológico, São Paulo, SP: E-mail: maira_kitty88@hotmail.com

⁶ Discente do Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP. E-mail: carolamerico@yahoo.com.br

positivas foi de 6,36% (IC 95% = 2,60% - 12,67%) e a prevalência de animais soropositivos foi de 0,82% (IC 95% = 0,38% - 1,56%). Não realizar vermifugação (*odds ratio* = 10,49; $p = 0,035$) e realizar corte e desinfecção de umbigo (*odds ratio* = 12,73; $p = 0,034$) foram identificados como fatores de risco. Também foi verificada associação entre histórico de hematúria nos rebanhos e prevalência de rebanhos positivos ($p = 0,007$). Os resultados obtidos indicam a circulação viral em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba.

Palavras-chave: caprinocultura leiteira, sanidade animal, *Pestivirus*, epidemiologia

Abstract

The aim of this survey was to determine the prevalence of anti-pestivirus antibodies in dairy goats from the semiarid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil, as well as to identify risk factors associated with the flock-level prevalence. A total of 1,092 dairy goats from 110 flocks randomly selected in the county of Monteiro, Paraíba state, during March 2009 to March 2010, were used. In each selected flock a epidemiological questionnaire was applied to verify the occurrence of possible factors that could be associated with the flock-level prevalence. For the serological diagnosis of *Pestivirus* infection the serum neutralization test, using the BVDV-1 NADL strain, was carried out. Flock-level prevalence was 6.36% (95% CI = 2.60% - 12.67%) and animal-level prevalence was 0.82% (95% CI = 0.38% - 1.56%). Not to perform vermifugation (*odds ratio* = 10.49; $p = 0.035$) and to perform navel cut and disinfection (*odds ratio* = 12.73; $p = 0.034$) were identified as risk factors. There was also association between history of hematuria and flock-level prevalence ($p = 0.007$). These results indicate viral circulation in dairy goats in the semiarid region of the Paraíba state.

Keywords: Dairy goat breeding, animal health, *Pestivirus*, epidemiology

Introdução

Os vírus do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*, tem a capacidade de infectar naturalmente ruminantes domésticos e silvestres, e suídeos. Os três principais vírus de importância em medicina veterinária são o da peste suína clássica para os suínos, o vírus

da diarreia viral bovina (BVDV) para os ruminantes e o vírus da doença das fronteiras (*Border Disease* – BD) para pequenos ruminantes. Estes vírus relacionam-se antigenicamente, embora a reatividade sorológica cruzada seja baixa, podendo ser bastante variável entre diferentes isolados de uma mesma espécie viral (MURPHY et al., 1999).

No Brasil, há relatos de BVDV desde o final dos anos 1960. Descrições clínico-patológicas e sorológicas demonstraram a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro. Os índices de soropositividade nos bovinos variam de 18% a 84% para os dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2) no país (RIDPATH; FLORES, 2007). Os bezerras persistentemente infectados (PI) representam as principais fontes de infecção do vírus. Esses animais excretam o vírus continuamente em altos títulos em secreções, no entanto, em baixos títulos em excreções. O vírus pode ser transmitido entre animais principalmente por contato direto, transmissão iatrogênica, inseminação artificial com sêmen de animais PI e transmissão vertical (THURMOND, 2005). Na Paraíba, Thompson et al. (2006) relataram soroprevalência de 22,2% (520/2343) para BVDV em bovinos. Em nível nacional, apenas dois estudos foram conduzidos com o objetivo de determinar a ocorrência de caprinos soropositivos para BVDV, ambos no Estado de Pernambuco, com frequências de anticorpos de 11,6% (16/410) e 10,89% (45/413) (CASTRO et al., 1994; SILVA, 2009).

Em caprinos, a ocorrência de casos clínicos da infecção por *Pestivirus* é baixa, no entanto, a doença pode apresentar-se de forma branda a severa (KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2006). Por outro lado, a ocorrência de animais PI garante a persistência do vírus nos rebanhos. As perdas econômicas ocasionadas estão relacionadas à diminuição na produtividade do rebanho, apresentando como consequências diminuição na qualidade do sêmen, diminuição da concepção de fêmeas infectadas, mortalidade fetal, abortamentos, malformações e natimortalidade (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005). Há relatos de abortamento espontâneo em caprinos causado pelo vírus BD (BECHER et al., 1997). Kim et al. (2006) referiram um surto de BD na Coreia com 500 mortes entre 600 caprinos infectados em rebanho composto por 1.700 animais; nesse surto, os animais apresentaram diarreia severa, caquexia, mortalidade neonatal e abortamentos.

Os caprinos apresentam importância econômica em muitos países, incluindo o Brasil, onde esses animais são importantes fontes de carne e leite para seres humanos,

particularmente na região Nordeste, na qual 93,7% dos caprinos estão concentrados (BRASIL, 2009). Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de rebanhos caprinos leiteiros positivos e de animais soropositivos para a infecção por *Pestivirus*, bem como identificar fatores de risco associados com a condição de foco no semiárido paraibano.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido durante o período de março de 2009 a março de 2010 no Município de Monteiro (Figura 1), microrregião do Cariri Ocidental, região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil. O clima da região é semiárido, com temperatura média de 22^oC. 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).

O delineamento amostral utilizado foi de um estudo transversal, e a amostragem foi delineada para a determinação da prevalência de propriedades positivas (focos), sendo realizada em duas etapas: (1) uma 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; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (THRUSFIELD, 2007):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de propriedades amostradas

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%

P = prevalência esperada de 50% (utilizada para a maximização da amostra)

d = erro absoluto de 5%

Para o ajuste para populações finitas, foi utilizada a seguinte fórmula (THRUSFIELD, 2007):

$$n_{ajus} = \frac{N \times n}{N + n}$$

Onde:

n_{ajus} = tamanho da amostra ajustado

N = tamanho da população total

n = tamanho inicial da amostra

De acordo com o Centro de Desenvolvimento Integrado da Caprinovinocultura (CENDOV), haviam 155 propriedades de exploração de cabras leiteiras cadastradas. Com base nesses dados, o número de unidades primárias a serem visitadas foi de 110.

Em seguida, o número de caprinos a serem selecionados foi determinado individualmente por rebanho para a detecção da presença da infecção, utilizando a seguinte fórmula (THRUSFIELD, 2007):

$$n = \left[1 - (1 - p)^{\frac{1}{d}} \right] \times \left(N - \frac{d}{2} \right) + 1$$

Onde:

n – tamanho da amostra

p – probabilidade de detecção de pelo menos um animal soropositivo

N – tamanho do rebanho

d – número de animais soropositivos no rebanho

A probabilidade de detecção de pelo menos um animal soropositivo no rebanho foi determinada no nível de confiança de 95% ($p = 0,95$), e o número de animais soropositivos por rebanho (d) foi calculado assumindo prevalência intra-rebanho de 10,89% (SILVA, 2009).

No total, foram amostradas sistematicamente 1.092 fêmeas caprinas adultas procedentes de 110 propriedades. Foram colhidos 10 ml de sangue da veia jugular

utilizando tubos a vácuo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas e os soros armazenados a -20°C até a realização da sorologia.

Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Pestivirus* foi utilizada a técnica de vírus neutralização (OIE, 2008). Inicialmente as amostras de soro foram inativadas a 56°C por 30 minutos. Os anticorpos neutralizantes presentes no soro foram qualificados e quantificados em placas de 96 cavidades, com triagem em quadruplicata e diluição 1:10. Quando houvesse reação em duas ou mais cavidades, realizava-se a titulação seriada em duplicata, com diluição de 1:10 até a 1:5120. Em seguida, adicionou-se ao soro 200 DICT₅₀/50 μL da cepa viral BVDV-1 NADL, com incubação a 37°C em estufa de CO_2 a 5% por uma hora. Depois acrescentou-se 50 μL de suspensão de células epiteliais de rim de bovino (MDBK) na concentração de 3×10^5 células/mL, com incubação por 96 horas a 37°C em estufa de CO_2 a 5%. A leitura foi realizada em microscópio invertido, considerando reagentes as amostras que apresentaram título igual ou superior a 10. O título infeccioso utilizado foi $10^{4,6}$ DICT₅₀/50 μL , determinado pelo método de Reed e Muench (1938).

Nas propriedades visitadas foi aplicado um questionário epidemiológico estruturado para a coleta de informações acerca de variáveis que pudessem atuar como possíveis fatores de risco. Foram utilizadas variáveis relacionadas às características das propriedades e à ocorrência de sinais clínicos nos rebanhos. As variáveis relacionadas às características das propriedades foram: tipo de criação, tipo e finalidade da exploração, tamanho do rebanho, contato com bovinos, assistência veterinária, compra de animais, suplementação na alimentação, tipo da fonte de água para os animais, existência do centro de manejo, tipo de aprisco, uso de pastos compartilhados, monta natural, uso comum de sêmen com outras propriedades, vermifugação, realização de corte e desinfecção de umbigo, quarentena dos animais que chegam na propriedade, separação de animais jovens, enterrar ou cremar os animais mortos, higiene das instalações e utilização de piquetes de parição. As variáveis relacionadas à ocorrência de sinais clínicos foram: abortamento, corrimento vaginal, infertilidade, nascimento prematuro, ocorrência de natimortos, nascimento de animais fracos, morte de cabritos ao desmame, orquite/epididimite, doenças articulares, hematúria, diarreia, tosse, corrimentos oculares e/ou nasais, depressão e conjuntivite. As informações obtidas foram inseridas em um formulário eletrônico elaborado no programa Microsoft Access[®] e utilizadas na análise de fatores de risco.

Para a análise de possíveis fatores de risco associados com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Pestivirus* foram utilizados os dados coletados nos questionários epidemiológicos. Uma propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. A análise de fatores de risco foi conduzida em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, 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 (ZAR, 1999) foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (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*.

Resultados e discussão

Das 110 propriedades utilizadas sete apresentaram pelo menos um animal soropositivo, com prevalência de 6,36% (IC 95% = 2,60% - 12,67%), e dos 1.092 animais amostrados nove foram soropositivos, com soroprevalência de 0,82% (IC 95% = 0,38%- 1,56%). As prevalências de rebanhos positivos e de animais soropositivos foram inferiores àquelas encontradas por Silva (2009) em rebanhos caprinos no Estado de Pernambuco, com 60,49% de propriedades positivas (49/81) e 10,89% (45/413) de caprinos soropositivos. Essa discrepância entre os resultados pode estar associado ao manejo higiênico-sanitário e reprodutivo geralmente adotado em propriedades de caprinos leiteiros, o que pode contribuir para a diminuição da disseminação do agente.

Por outro lado, a inexistência de caprinos PI poderia contribuir para a baixa prevalência de animais reagentes encontrada no presente trabalho, pois se houvesse caprinos PI a prevalência de animais reagentes seria alta, tendo em vista que estes não apresentam anticorpos e eliminam o vírus em grande quantidade, infectando os susceptíveis (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005). Para comprovar a presença de animais PI é necessária a utilização de técnicas diretas para a detecção do vírus nesses animais. No entanto, tem sido relatado que as menores frequências de animais PI ocorrem entre os caprinos. Loken (1995) referiu prevalência de animais PI na Áustria de 0,08% em caprinos e 0,32 em ovinos.

A prevalência de animais soropositivos por rebanho variou de 8,33% a 37,5% (Tabela 1). Em seis propriedades positivas houve apenas um animal soropositivo, e apenas um rebanho apresentou três animais soropositivos entre oito testados, com títulos de 40, 80 e 160 (dados não apresentados), o que sugere a infecção prévia destes animais por um pestivírus e possivelmente de animais com infecção aguda. Levando-se em consideração que nessa propriedade há criação consorciada de caprinos e bovinos, a transmissão pode ter ocorrido entre as espécies (LOKEN, 1995; KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2010), e acredita-se que provavelmente os bovinos estejam atuando como fontes de infecção.

Na análise univariada para os fatores de risco, as variáveis relacionadas às características das propriedades, selecionadas para a análise múltipla, foram vermifugação ($p = 0,122$) e realização de corte e desinfecção do umbigo ($p = 0,062$) (Tabela 2). Ocorrência de hematúria ($p = 0,124$) e ocorrência de depressão ($p = 0,122$) foram as variáveis relacionadas aos sinais clínicos que foram selecionadas para a análise múltipla (Tabela 3). Quando essas variáveis foram utilizadas na análise múltipla, não realizar vermifugação (*odds ratio* = 10,49; $p = 0,035$) e realizar corte e desinfecção de umbigo (*odds ratio* = 12,73; $p = 0,034$) foram associadas à ocorrência de focos (Tabela 4). Também houve associação entre ocorrência de hematúria e prevalência de focos ($p = 0,007$). Optou-se por não calcular a *odds ratio* para a ocorrência de hematúria uma vez que essa condição não é um fator de risco, e sim uma consequência da infecção.

A vermifugação é uma das práticas mais utilizadas e importantes no manejo sanitário de pequenos ruminantes, de modo que a não realização dessa prática, apontada como fator de risco no presente trabalho, reflete a ausência de outras práticas sanitárias, o que pode contribuir para a ocorrência e disseminação de agentes infecciosos e, consequentemente, redução da produtividade do rebanho (SOUZA NETO; BAKER; SOUSA, 1996). Da mesma forma, esse fator de risco reflete a ocorrência de animais parasitados e com baixa resistência, propiciando a infecção por *Pestivirus*. Por outro lado, podemos considerar que a realização de vermifugação sem desinfecção adequada de materiais e conhecimento da condição sanitária do rebanho também pode contribuir para a transmissão do vírus, uma vez que a maioria dos proprietários preferem usar vermífugo oral, e a saliva de animais PI ou de animais com infecção aguda é uma via de eliminação do BVDV, visto que animais PI excretam o vírus continuamente em altos títulos em saliva, secreções nasais e outras secreções e excreções, e animais com

infecção aguda também excretam o vírus por secreções e excreções, com títulos e duração da eliminação inferiores aos de animais PI (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005). Outros proprietários utilizam vermífugo injetável, e o BVDV pode ser transmitido por agulhas após terem sido utilizadas em animais PI, pois o vírus fica viável até três dias nesses materiais (GUNN, 1993).

A realização de corte e desinfecção de umbigo é um procedimento de manejo sanitário importante se realizado de maneira adequada, no entanto, foi identificado como fator de risco para a ocorrência de focos de infecção por *Pestivirus* no presente trabalho. Esse fato apresenta plausibilidade biológica, uma vez que o BVDV, por exemplo, pode sobreviver por dias a semanas em ambiente sombreado, conseqüentemente pode ocorrer a transmissão iatrogênica a animais susceptíveis quando expostos a equipamentos sem desinfecção adequada, previamente utilizados em animais PI ou em animais em infecção aguda (THURMOND, 2005). No entanto, é necessária a realização de investigações futuras para a verificação dessa possível via de transmissão na região de estudo.

Nos sinais clínicos, foi observada associação entre o histórico de hematúria nos rebanhos e a prevalência de focos. Até o presente momento, não há relatos de ocorrência de hemorragia no trato urinário de caprinos infectados por BVDV, no entanto, o BD já foi isolado de rins de um cabrito que nasceu fraco (LOKEN; BJERKAS, 1991) e de rins de cordeiros (LEES et al., 1991), bem como já foram reportadas ocorrências de infiltrações linfóides focais em rins de cabras infectadas experimentalmente.

Conclui-se que a ocorrência de caprinos soropositivos para *Pestivirus* demonstra a circulação viral em rebanhos de caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba. Sugere-se a necessidade de investigações voltadas para a identificação de animais PI, uma vez que, na região Nordeste, a criação consorciada de bovinos e pequenos ruminantes é uma prática amplamente utilizada, o que pode facilitar a transmissão viral entre as espécies, embora o contato com bovinos não tenha sido identificado como fator de risco no presente trabalho. Sugere-se também a importância da condução de trabalhos educativos junto aos proprietários acerca das medidas de prevenção e controle da infecção, principalmente no tocante à correção dos possíveis fatores de risco identificados.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a Sérgio Santos de Azevedo.

Referências

BECHER, P.; ORLICH, M.; SHANNON, A. D.; HORNER, G.; KONIG, M.; THIEL, H. J. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology*, v. 78, n. 6, p. 1357–1366, 1997.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, SIDRA, 2009. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/>.

BROCK, K. V.; GROOMS, D. L.; GIVENS, M. D. Reproductive Diseases and Persistent Infections. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management, and control*. Iowa: Blackwell, 2005. p. 145-156.

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A. G.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra pestivirus e herpesvirus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, p. 577-578, 1994.

GUNN, H. M. Role of fomites and flies in transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record*, v. 132, n. 23, p. 584-585, 1993.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. *Applied logistic regression*. New York: John Wiley & Sons, 2000.

KIM, I. J.; HYUN, B. H.; SHIN, J. H.; LEE, K. K.; LEE, K. W.; CHO, K. O.; KANG, M. I. Identification of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Research*, v. 121, p. 103–106, 2006.

KRAMETTER-FROETSCHER, R. K.; DUENSER, M.; PREYLER, B.; THEINER, A.; BENETKA, V.; MOESTI, K.; BAUMGARTNER, W. Pestivirus infection in sheep and goats in west Austria. *The Veterinary Journal*, v. 186, p. 342-346, 2010.

KRAMETTER-FROESTSCHER, R. K.; LOITSCH, A.; KOHLER, H.; SCHLEINER, A.; SCHIEFER, P.; MOESTL, K.; GOLJA, F. Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v. 53, p. 48–50, 2006.

LEES, V. W.; LOEWEN, K. G.; DEREGT, D.; KNUDSEN, R. Isolation of border disease virus from twin lambs in Alberta. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 32, n. 11, p. 678–682, 1991.

LOKEN, T.; BJERKAS, I. Experimental Pestivirus infections in pregnant goats. *Journal of Comparative Pathology*, v. 105, n. 2, p. 123-140, 1991.

LOKEN, T. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.11, n. 3, p. 597-614, 1995.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. *Veterinary virology*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999.

OIE. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

Bovine viral diarrhoea, 2008. Disponível em:
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONG_UE.pdf>.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 563-592.

SILVA, T. L. A. Anticorpos anti-pestivírus em caprinos e ovinos do sertão do estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

SOUZA NETO, J.; BAKER, G. A.; SOUSA, F. B. Caprinocultura de duplo propósito no Nordeste do Brasil: avaliação do potencial produtivo. Sobral: Embrapa Caprinos. p.210-212. 1996. (Relatório técnico do CNPC 1987-1995).

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. M. H.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, Z. I. P.; BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 76, p. 290–301, 2006.

THURMOND, M. C. Virus transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.). *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control*. Iowa: Blackwell, 2005. p. 91-104.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 2007.

ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999.

Legenda da figura:

Figura 1. Localização geográfica do Município de Monteiro, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Patos-PB, 2012.

Figura 1.

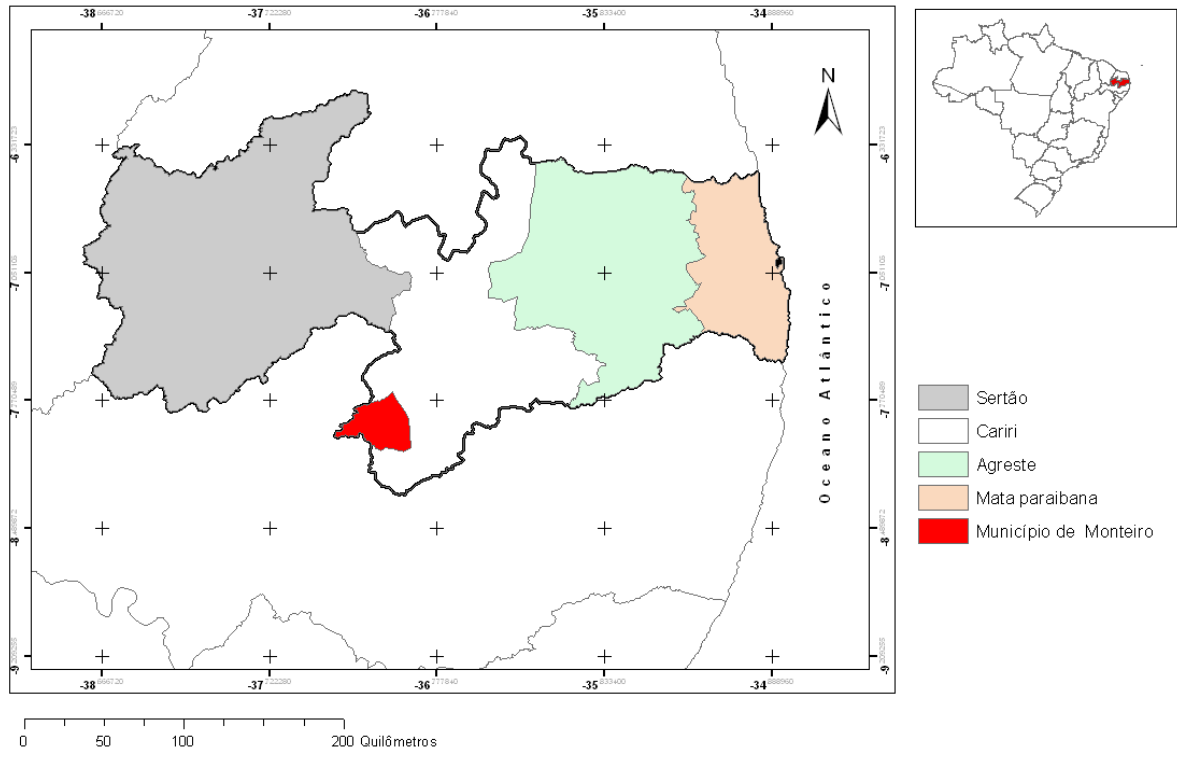


Tabela 1. Prevalência intra-rebanho para *Pestivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.

Identificação do rebanho	Número de animais amostrados	Número de animais soropositivos	Prevalência intra-rebanho (%)	IC 95% (%)
9	11	1	9,09	0,23 - 41,28
31	12	1	8,33	0,21 - 38,48
42	12	1	8,33	0,21 - 38,48
44	12	1	8,33	0,21 - 38,48
45	6	1	16,67	0,42 - 64,12
50	12	1	8,33	0,21 - 38,48
95	8	3	37,50	0,52 - 75,51

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 2. Análise univariada com as variáveis relacionadas às características das propriedades em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.

Variáveis	No. total de propriedades	No. de propriedades positivas (%)	Valor de p
Tipo de criação			
Intensiva	2	0(0,0)	
Semi-intensiva	101	7 (6,9)	
Extensiva	7	0 (0,0)	0,717
Tipo de exploração			
Cria	92	7 (7,6)	
Recria/engorda	7	5 (71,4)	
Reprodução	5	0 (0,0)	
Subsistência	6	0 (0,0)	0,619
Finalidade da exploração			
Corte	2	0 (0,0)	
Leite	101	7 (6,9)	
Mista	7	0 (0,0)	0,717
Tamanho do rebanho			
Até 31 animais	57	4 (7,0)	
Mais de 31 animais	53	3 (5,7)	1,000
Contato com bovinos			
Não	35	1 (2,9)	
Sim	75	6 (8,0)	0,427
Assistência veterinária			
Não	104	7 (6,7)	
Sim	6	0 (0,0)	1,000
Compra de animais			
Não	75	6 (8,0)	
Sim	35	1 (2,9)	0,427
Suplementação na alimentação			
Não	2	0 (0,0)	
Sim	108	7 (6,5)	1,000
Fonte de água para os animais ser bebedouros			
Não	48	4 (8,3)	
Sim	62	3 (4,8)	0,697
Fonte de água para os animais ser rios			
Não	57	2 (3,5)	
Sim	53	5 (9,4)	0,259
Centro de manejo			
Não	79	4 (5,1)	
Sim	31	3 (9,7)	0,400
Tipo de aprisco			
Chão batido	109	7 (6,4)	
Cimentado	1	00 (00)	1,000
Pastos compartilhados			

Não	97	6 (6,2)	
Sim	13	1 (7,7)	1,000
Monta natural			
Não	3	0 (0,0)	
Sim	107	7 (6,5)	1,000
Uso comum de sêmen com outras propriedades			
Não	67	5(7,5)	
Sim	43	2 (4,7)	0,703
Vermifugação			
Não	10	2 (20,0)	
Sim	100	5(5,0)	0,122*
Realização de corte e desinfecção de umbigo			
Não	76	2 (2,6)	
Sim	32	4 (12,5)	0,062*
Quarentena de todos os animais que chegam na propriedade			
Não	99	7 (7,1)	
Sim	11	0 (0,0)	1,000
Separação dos animais jovens			
Não	59	3 (5,1)	
Sim	51	4 (7,8)	0,702
Enterrar ou cremar animais mortos			
Não	102	6 (5,9)	
Sim	8	1 (12,5)	0,420
Realização de higiene das instalações			
Não	62	4 (6,5)	
Sim	48	3 (6,2)	1,000
Utilização de piquetes de parição			
Não	101	6 (5,9)	
Sim	9	1 (11,1)	0,460

* Variáveis usadas na análise múltipla ($p \leq 0,20$)

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 3. Análise univariada com as variáveis relacionadas aos sinais clínicos em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.

Variáveis	No. total de propriedades	No. de propriedades positivas (%)	Valor de p
Abortamento			
Não	59	5 (8,5)	
Sim	51	2 (3,9)	0,447
Corrimento vaginal			
Não	104	6 (5,8)	
Sim	6	1 (16,7)	0,332
Infertilidade			
Não	101	6 (5,9)	
Sim	9	1 (11,1)	0,460
Nascimento prematuro			
Não	98	6 (6,1)	
Sim	12	1 (8,3)	0,565
Ocorrência de natimortos			
Não	86	6 (7,0)	
Sim	24	1 (4,2)	1,000
Nascimento de animais fracos			
Não	84	6 (7,1)	
Sim	26	1 (3,8)	1,000
Morte dos cabritos ao desmame			
Não	97	7 (7,2)	
Sim	13	0 (0,0)	1,000
Orquite/Epididimite			
Não	107	7 (6,5)	
Sim	3	0 (0,0)	1,000
Doenças articulares			
Não	107	7 (6,5)	
Sim	3	0 (0,0)	1,000
Hematúria			
Não	108	6 (5,6)	
Sim	2	1 (50,0)	0,124*
Diarréia			
Não	32	2 (6,2)	
Sim	78	5 (6,4)	1,000
Tosse			
Não	85	5 (5,9)	
Sim	25	2 (8,0)	0,656
Corrimentos oculares e/ou nasais			
Não	81	5 (6,2)	
Sim	29	2 (6,9)	1,000
Depressão			
Não	98	7 (7,1)	
Sim	12	0 (0,0)	0,122*
Conjuntivite			

Não	87	5 (5,7)	
Sim	23	2 (8,7)	0,635

* Variáveis usadas na análise múltipla ($p \leq 0,20$);

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 4. Fator de risco para a ocorrência de propriedades positivas para *Pestivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010. Patos-PB, 2012.

Fatores de risco	Oddsratio	IC 95%	p
Não realizar vermifugação	10,49	1,18 – 93,23	0,035
Realizar corte e desinfecção de umbigo	12,73	1,21 – 134,20	0,034
Hematúria	0,007

Fonte: Elaboração dos autores

Capítulo III

Prevalência e fatores de risco para a língua azul em propriedades de caprinos leiteiros do semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

Artigo enviado para publicação no periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Prevalência e fatores de risco para a língua azul em propriedades de caprinos leiteiros do semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

[Flock-level prevalence and risk factors associated with bluetongue in dairy goats in the semiarid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil]

M.L.C.R. Silva¹, E.M. Pituco², A.H.C. Nogueira², C.S.A.B. Santos³, S.S.S. Higino¹,
C.J. Alves¹, S.S. Azevedo^{1*}

¹Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - Centro de Saúde e Tecnologia Rural -
Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Patos, PB

²Instituto Biológico de São Paulo - São Paulo, SP

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo - São
Paulo, SP

* E-mail: sergio.azevedo@pq.cnpq.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de caprinos leiteiros portadores de anticorpos contra o vírus da língua azul no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, bem como identificar fatores de risco associados à prevalência de rebanhos positivos. Foram utilizados 1.088 cabras leiteiras de 110 propriedades selecionadas aleatoriamente no Município de Monteiro, Estado da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010. Em cada propriedade selecionada foi aplicado questionário epidemiológico para verificar a ocorrência de possíveis fatores associados à ocorrência da infecção. Para o diagnóstico sorológico, foram utilizados os testes de ELISA competitivo e de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). As prevalências de propriedades positivas e de animais reagentes foram de 59,1% e 12,1%, respectivamente, no ELISA, e de 8,2% e 1,1%, respectivamente, na IDGA. Produção diária de leite superior a 19 litros (*odds ratio* = 3,78; *p* = 0,003) foi identificada como fator de risco. Os resultados obtidos indicam a circulação do vírus da língua azul em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba.

Palavras-chave: caprinocultura leiteira, sanidade animal, *Orbivirus*, epidemiologia

ABSTRACT

The aim of this survey was to determine the prevalence of anti-bluetongue virus antibodies in dairy goats from the semiarid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil, as well as to identify risk factors associated with the flock-level prevalence. A total of 1,088 dairy goats from 110 flocks randomly selected in the county of Monteiro, Paraíba state, during March 2009 to March 2010, were used. In each selected flock a epidemiological questionnaire was applied to verify the occurrence of possible factors that could be associated with the flock-level prevalence. For the serological diagnosis a competitive ELISA test and the agar gel immunodiffusion test (AGID) were carried out. Flock-level and animal-level prevalences were 59.1% and 12.1%, respectively, at the ELISA, and 8.2% and 1.1%, respectively, at the AGID test. Daily milk production upper to 19 liters (odds ratio = 3.78; $p = 0.003$) was identified as risk factor. These results indicate circulation of the bluetongue virus in dairy goats in the semiarid region of the Paraíba state.

Keywords: dairy goat breeding, animal health, Orbivirus, epidemiology.

INTRODUÇÃO

A língua azul (LA) é uma doença infecciosa causada por um vírus da família *Reoviridae* gênero *Orbivirus*, transmitido principalmente por insetos vetores do gênero *Culicoides*, podendo ocorrer em menor intensidade através de fluido seminal, transplacentária e procedimentos iatrogênicos. Os isolados do vírus são agrupados em 26 sorotipos, que apresentam variações de patogenicidade e virulência entre os isolados de campo, e com diferentes padrões de tropismo tecidual e fetal (Flores, 2007). O sorotipo 25 foi identificado em caprinos na Suíça, denominado *Toggenburg Orbivirus* (Holfmann *et al.*, 2008; Chaignat *et al.*, 2009), e o sorotipo 26 foi identificado em ovinos e caprinos no Kuwait (Maan *et al.*, 2011; Batten *et al.*, 2012).

Acredita-se que todos os ruminantes sejam susceptíveis ao vírus da LA, mas os sinais clínicos da doença são observados com mais frequência em ovinos. Em caprinos,

a manifestação clínica é rara e ocorre de maneira branda com alteração da temperatura corporal, anemia leve e discreta hiperemia, ou aumento do volume sanguíneo das mucosas conjuntiva e nasal (Clavijo *et al.*, 2002). Experimentalmente, os caprinos desenvolvem viremia com títulos virais maiores e de maior duração que os ovinos, conferindo aos primeiros uma maior importância epizootiológica (Cunha *et al.*, 1988).

O primeiro registro de LA na América do Sul foi em 1978 (Cunha, 1990). Há evidência sorológica da infecção em bovinos, ovinos e caprinos em vários Estados do Brasil. Na Paraíba, foram encontradas frequências de animais reagentes de 4,82% em bovinos (Melo *et al.*, 2000) e de 8,4% em ovinos (Alves *et al.*, 2009). Em caprinos, há relatos de frequências de 5,9 % (Silva *et al.*, 1988) e 42% (Lobato *et al.*, 2001) em Minas Gerais, 44,08% no Rio de Janeiro (Cunha *et al.*, 1988) e 3,9% em Pernambuco (Mota *et al.*, 2011). Na Paraíba, não há relatos de ocorrência de caprinos soropositivos.

Poucos são os relatos de manifestação clínica em ruminantes no Brasil. Em 2001 houve um surto de LA em Campo do Tenente, Paraná, sendo acometidos de forma severa oito ovinos e um caprino. O caprino apresentou febre, depressão, hiperemia da cavidade oral, edema facial, especialmente nos lábios, língua, focinho e espaço submandibular; na necropsia foram observadas necrose do epitélio do nariz e língua, hiperemia e petéquias hemorrágicas na faringe, esôfago e mucosas ruminal e omasal, sendo a primeira confirmação da doença clínica no Brasil (Clavijo *et al.*, 2002). Em 2002, na mesma área, de 154 caprinos susceptíveis, 29 apresentaram sinais clínicos de infecção pelo vírus da LA, dos quais 31 morreram (Lager, 2004).

Até o momento, apenas dois sorotipos do vírus da LA foram isolados no Brasil: BTV-4 em um bovino após exportação para a Flórida (Grocock e Campbell, 1982), e BTV-12 em surto que acometeu ovinos e caprinos em 2001 no Paraná (Clavijo *et al.*, 2002) e em outro surto em ovinos no Rio Grande do Sul em 2010 (Antoniassi *et al.*, 2010).

O impacto econômico da LA decorre de restrições impostas por países importadores, que requerem a certificação de animais livres da infecção, e também de perdas indiretas, como queda na produção de leite e carne, diminuição do período de lactação, abortamentos e nascimento de animais fracos (Breard *et al.*, 2004; Aradaib *et al.*, 2005).

Os caprinos apresentam importância econômica em muitos países, incluindo o Brasil, onde esses animais são importantes fontes de carne e leite para seres humanos,

particularmente na região Nordeste, na qual 93,7% dos caprinos estão concentrados (Brasil, 2009). Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de rebanhos caprinos leiteiros positivos e de animais reagentes para a o vírus da LA, bem como identificar fatores de risco associados com a condição de foco no semiárido paraibano.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido durante o período de março de 2009 a março de 2010 no Município de Monteiro (Fig. 1), microrregião do Cariri Ocidental, região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil. A temperatura média da região é de 22⁰C, tendo altitude de 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).

O planejamento amostral utilizado foi de um estudo transversal, e a amostragem foi delineada para a determinação da prevalência de propriedades positivas (focos), sendo realizada em duas etapas: (1) uma 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).

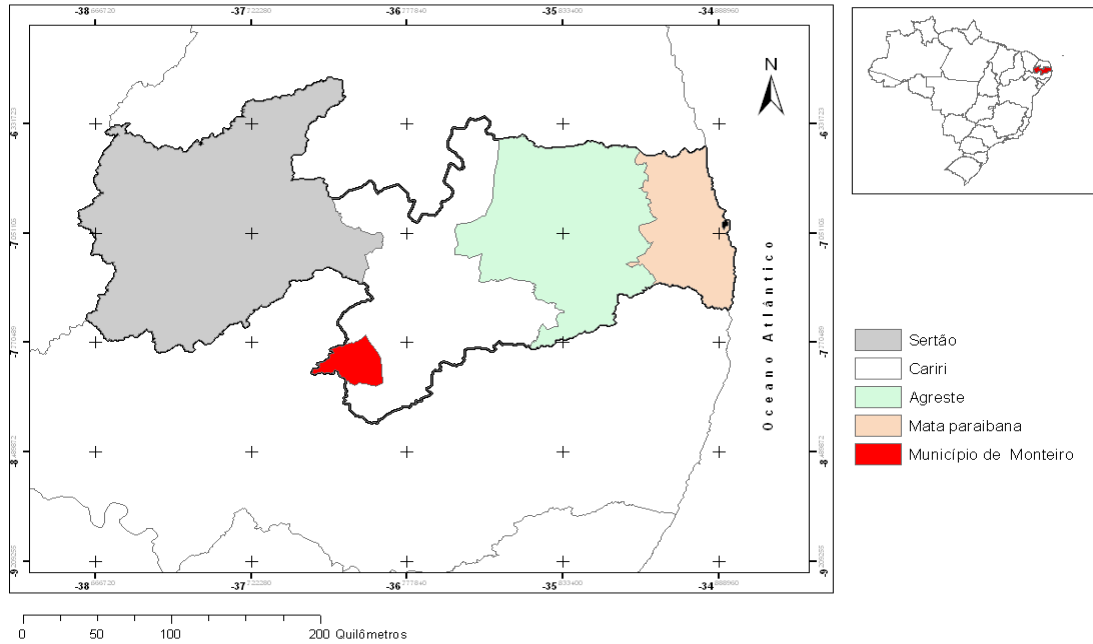


Figura 1. Localização geográfica do Município de Monteiro, semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Para o cálculo do número de unidades primárias a serem amostradas, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (Thrusfield, 2007):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de propriedades amostradas

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%

P = prevalência esperada de 50% (utilizada para a maximização da amostra)

d = erro absoluto de 5%

Para o ajuste para populações finitas, foi utilizada a seguinte fórmula (Thrusfield, 2007):

$$n_{ajus} = \frac{N \times n}{N + n}$$

Onde:

n_{ajus} = tamanho da amostra ajustado

N = tamanho da população total

n = tamanho inicial da amostra

De acordo com o Centro de Desenvolvimento Integrado da Caprinovinocultura (CENDOV), haviam 155 propriedades de exploração de cabras leiteiras cadastradas. Com base nesses dados, o número de unidades primárias a serem visitadas foi de 110.

Em seguida, o número de caprinos a serem selecionados foi determinado individualmente por rebanho para a detecção da presença da infecção, utilizando a seguinte fórmula (Thrusfield, 2007):

$$n = \left[1 - (1 - p)^{\frac{1}{d}} \right] \times \left(N - \frac{d}{2} \right) + 1$$

Onde:

n – tamanho da amostra

p – probabilidade de detecção de pelo menos um animal soropositivo

N – tamanho do rebanho

d – número de animais soropositivos no rebanho

A probabilidade de detecção de pelo menos um animal soropositivo no rebanho foi determinada no nível de confiança de 95% ($p = 0,95$), e o número de animais soropositivos por rebanho (d) foi calculado assumindo prevalência intra-rebanho de 3,9% (Mota *et al.*, 2011).

No total, foram amostradas sistematicamente 1.088 fêmeas caprinas adultas procedentes de 110 propriedades. Foram colhidos 10 ml de sangue da veia jugular utilizando tubos a vácuo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas e os soros armazenados a -20°C até a realização da sorologia.

Para o detecção de anticorpos anti-vírus da LA, as amostras foram submetidas ao ensaio imunoenzimático competitivo em fase sólida (ELISA-CFS), e as amostras

reagentes ao ELISA-CFS foram submetidas à imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA), utilizando-se kits fornecidos pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, realizados segundo protocolo do fabricante. Todos os procedimentos adotados seguiram as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2009).

Nas propriedades visitadas foi aplicado questionário epidemiológico estruturado para a coleta de informações acerca de variáveis que pudessem atuar como possíveis fatores de risco. As variáveis investigadas estão apresentadas na Tabela 1. As informações obtidas foram inseridas em um formulário eletrônico elaborado no programa Microsoft Access[®] e utilizadas na análise de fatores de risco.

Para a análise de possíveis fatores de risco associados com a condição de propriedade positiva para a infecção pelo vírus da LA foram utilizados os dados coletados nos questionários epidemiológicos. Uma propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos um animal reagente. A análise de fatores de risco foi conduzida em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, 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 (Zar, 1999) foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (Hosmer e 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*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ELISA, das 110 propriedades utilizadas 65 apresentaram pelo menos um animal reagente ao vírus da LA, com prevalência de 59,1% (IC 95% = 49,3%-68,4%), e dos 1.088 animais, 132 foram soropositivos, com prevalência de 12,1% (IC 95% = 10,3%-14,2%). Pelo teste de IDGA, das 65 propriedades positivas no ELISA, apenas nove foram positivas, e dos 132 animais soropositivos no ELISA, apenas 12 na IDGA, resultando nas prevalências de propriedades positivas e de animais reagentes de 8,2% (9/110) e de 1,1% (12/1088). Resultados similares foram encontrados por Shringi e Shringi (2005), que detectaram, no ELISA, 30,3% (54/178) de caprinos e ovinos soropositivos na Índia, e na IDGA, 9,5% (17/178) dos animais foram soropositivos. A diferença entre os testes pode ser atribuída à elevada sensibilidade do ELISA competitivo em relação à IDGA, pois o ELISA detecta anticorpos virais em níveis de

baixa concentração (cerca de 0,0005 $\mu\text{g/mL}$) e precocemente (Poli *et al.*, 1982). Koumbati *et al.* (1999) infectaram experimentalmente caprinos e ovinos com o BTV-4 e detectaram anticorpos no ELISA competitivo no sexto dia pós-infecção, enquanto que na IDGA (concentração cerca de 30,00 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos), foram detectados a partir do décimo dia pós-infecção. Batten *et al.* (2012) infectaram experimentalmente ovinos com o BTV-4 e os animais soroconverteram sete dias pós-infecção, com a detecção de anticorpos realizada com o ELISA.

No presente trabalho, as prevalências de propriedades positivas e de animais reagentes determinadas pelo ELISA foram superiores àquelas encontradas por Lee *et al.* (2009) em rebanhos caprinos de Taiwan, que referiram prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos de 28,9% (13/45) e de 8,2% (111/1350), respectivamente, também utilizando o ELISA competitivo. As elevadas prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos pelo ELISA encontradas no presente trabalho podem estar relacionadas com a época de colheita dos soros, que coincidiu com os maiores índices pluviométricos na região, associado a temperatura e umidade adequada e a outros fatores ambientais como vegetação que determinam a multiplicação e manutenção dos vetores (*Culicoides* spp). Os índices pluviométricos na Paraíba, no ano de 2009, ficaram entre os mais altos nos últimos 15 anos (AESAs, 2011). Outro fator que pode ter influenciado na alta prevalência é a idade dos animais utilizados (fêmeas caprinas com idade igual ou superior a um ano), o que sugere aumento da probabilidade de exposição ao agente e ao vetor em função da idade. Silva *et al.* (1988) relataram maior frequência de positividade na IDGA em caprinos com idade superior a 12 meses, e também associaram esse fato ao maior tempo de exposição às fontes de infecção.

Na análise univariada para os fatores de risco (Tab. 1), as variáveis selecionadas para a análise múltipla foram tipo de criação ($p = 0,144$), tipo de exploração ($p = 0,128$), número de cabras em lactação ($p = 0,018$), produção diária de leite ($p = 0,008$), compra de animais ($p = 0,195$), corte e desinfecção de umbigo ($p = 0,024$) e separação de animais jovens ($p = 0,032$). Quando essas variáveis foram utilizadas na análise múltipla, apenas a variável produção diária de leite superior a 19 litros (*odds ratio* = 3,78; $p = 0,003$) foi identificada como fator de risco (Tab. 2).

Tabela 1. Análise univariada para os fatores de risco com as variáveis mais associadas ($p \leq 0,20$) com a ocorrência de propriedades positivas para o vírus da língua azul em

caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de março de 2009 a março de 2010

Variáveis	No. total de propriedades	No. de propriedades positivas (%)	Valor de p
Tipo de criação			
Intensiva	2	0 (0,0)	
Semi-extensiva	101	62 (61,4)	
Extensiva	7	3 (42,9)	0,144*
Tipo de exploração			
Cria	92	54 (58,7)	
Recria/engorda	7	3 (42,9)	
Reprodução	5	2 (40,0)	
Subsistência	6	6 (100,0)	0,128*
Finalidade de exploração			
Corte	2	0 (0,0)	
Leite	101	61 (60,4)	
Mista	7	4 (57,1)	0,226
Número de cabras em lactação			
Até 15 abras	70	35 (50,0)	
Mais de 15 cabras	40	30 (75,0)	0,018*
Produção diária de leite			
0-19 litros	68	33 (48,5)	
>19 litros	42	32 (76,2)	0,008*
Tamanho do rebanho			
Até 25 animais	57	31 (54,4)	
Mais de 25 animais	53	34 (64,2)	0,397
Contato com bovinos			
Não	35	21 (60,0)	
Sim	75	44 (58,7)	1,000
Presença de animais silvestres			
Não	81	50 (61,7)	
Sim	29	15 (51,7)	0,471
Assistência veterinária			
Não	104	61 (58,7)	
Sim	6	4 (66,7)	0,1000
Raça predominante no rebanho			
Pura	7	5 (71,4)	
Mista	103	60 (58,3)	0,698
Compra de animais			
Não	96	54 (56,2)	
Sim	14	11 (78,6)	0,195*
Fonte de água para os animais ser bebedouros			
Não	48	27 (56,2)	
Sim	62	38 (61,3)	0,736
Fonte de água para os animais ser aguadas			
Não	87	53 (60,9)	

Sim	23	12 (52,2)	0,603
Fonte de água para os animais ser rios			
Não	57	30 (52,6)	
Sim	53	35 (66,0)	0,217
Presença de pastos alagados			
Não	95	56 (58,9)	
Sim	15	9 (60,0)	1,000
Compartilhar pastos			
Não	97	55 (56,7)	
Sim	13	10 (76,9)	0,275
Vermifugação			
Não	10	6 (60,0)	
Sim	100	59(59,0)	1,000
Corte e desinfecção de umbigo			
Não	76	40 (52,6)	
Sim	32	25 (78,1)	0,024*
Quarentena no ingresso de animais			
Não	99	58 (58,6)	
Sim	11	7 (63,6)	1,000
Separação de animais jovens			
Não	59	29 (49,2)	
Sim	51	36 (70,6)	0,032*
Higiene das instalações			
Não	62	34 (54,8)	
Sim	48	31 (64,6)	0,404

* Variáveis selecionadas para a análise múltipla

Tabela 2. Fator de risco para a ocorrência de propriedades positivas para o vírus da língua azul em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, no período de maio de 2009 a março de 2010

Fator de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	Valor de p
Produção diária de leite > 19 litros	3,78	1,56 – 9,19	0,003

O fator de risco identificado no presente trabalho está relacionado com a alta produção leiteira e, portanto, não passível de intervenção. A variável número de cabras em lactação maior que 15, embora não apontada como fator de risco na análise multivariada, merece destaque. Esta variável está relacionada com o fator de risco identificado e pode ser justificada pelo fato de que na região semiárida da Paraíba a maioria dos caprinos vivem em regime semi-extensivo, e os proprietários concentram as

cabras em lactação a partir das 16:00 horas para oferecem suplementação visando maior produção de leite. Em decorrência dessa concentração de animais, há maior chance de ocorrência de vetores em virtude do acúmulo de fezes e urina, o que pode contribuir para a disseminação da infecção. Por outro lado, Van Der Sluijs *et al.* (2011) referiram a possibilidade de transmissão horizontal do vírus da LA em ovelhas concentradas em área de isolamento de animais sem, contudo, haver a presença de mosquitos vetores, o que poderia também ocorrer nas cabras quando estão concentradas e em contato com cabritos virêmicos.

A variável corte e desinfecção de umbigo, embora também não tenha sido apontada como fator de risco na análise multivariada, merece destaque. Propriedades nas quais tal prática é efetuada apresentaram frequência de positividade de 78,1%, contra 52,6% de positividade em propriedades nas quais tal prática não é realizada ($p = 0,024$) (Tab. 1). Isso pode estar diretamente relacionado com o manejo de materiais utilizados para o corte de umbigo, uma vez que animais infectados com o vírus da LA produzem viremia e são capazes de transmitir o vírus de forma indireta por materiais cirúrgicos contaminados (Flores, 2007).

CONCLUSÕES

Conclui-se que a elevada prevalência de propriedades com animais soropositivos demonstra a circulação do vírus da língua azul em rebanhos de caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba. Com base na análise de fatores de risco, sugerem-se maiores cuidados na concentração de animais no tocante ao controle de vetores, bem como utilização de materiais descartáveis nos procedimentos de corte e desinfecção de umbigo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a Sérgio Santos de Azevedo.

REFERENCIAS

AESA. Agência Executiva de Gestão das águas do Estado da Paraíba. Meteorologia, 2012. Disponível em: <<http://www.aesa.pb.gov.br>>. Acessado em: 30 jul. 2012.

ANTONIASI, N.A.B.; PAVARINI, S.P.; RIBEIRO, L.A.O. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, n.12, p.1010-1016, 2010.

ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S. S. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.39, n.2, p.484-489, 2009.

ARADAIB, I.E.; MOHAMED, M.E.H.; ABDALLA, T.M. et al. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, v.111, n.3-4, p.145-150, 2005.

BATTEN, C.A.; HENSTOCK, M.R.; BIN-TARIF, A. et al. Bluetongue virus serotype 26: Infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. *Vet. Microbiol.*, v.157, n.1-2, p. 119–124, 2012.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, SIDRA, 2009. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/>. Acessado em: 12 jul. 2012.

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S. et al. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res. Vet. Sci.*, v.77, n.1, p.1-8, 2004.

CHAIGNAT, V.; WORWAA, G.; SCHERRER, N. et al. Toggenberg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observation in the field and experimental infection of sheep and goats. *Vet. Microbiol.*, v.138, n.1-2, p.11–19, 2009.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J. et al. Isolation of Bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet. Rec.*, v.151, n.10, p.301-302, 2002.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. *Arq. Flum. Med. Vet.*, v.3, n.2, p.53-56. 1988.

CUNHA, R.G. Neutralizing antibodies for different serotypes of bluetongue virus in sera of domestic ruminants from Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.12, p.3-7, 1990.

FLORES, E.F. (Ed). *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. 888p.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.*, v.46, p.160-164, 1982.

HOLFMANN, M.A.; RENZULLO, S.; MADDER, M. et al. Genetic characterization of Toggenberg Orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, n.12, p.1855-1861, 2008.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. (Eds.). *Applied logistic regression*. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375p.

KOUMBATI, M.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K. et al. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet. Microbiol.*, v.64, n.4, p.277-285, 1999.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: Overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet. Ital.*, v.40, p.89-93, 2004.

LEE, F.; TING, L.; JONG, M. et al. Subclinical bluetongue virus infection in domestic ruminants in Taiwan. *Vet. Microbiol.*, v.142, n.3-4, p.225-231, 2010.

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F. et al. Língua azul em ovinos e caprinos da região mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4., 2001, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: SBB, 2001. p.165. (Resumo).

MAAN, S.; MAAN, N.S.; NOMIKOU, K. et al. Novel bluetongue vírus serotype from Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.*, v.17, n.5, p.886–889, 2011.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.1, p.19-20, 2000.

MOTA, I.O.; CASTRO, R.S.; ALENCAR, S.P. et al. Anticorpos contra vírus do grupo da língua azul em caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco e inferências sobre sua epidemiologia em regiões semiáridas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1595-1598, 2011

OIE. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease, 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf>. Acessado em: 30 jul. 2012.

POLI, G.; STOTT, J.; LIU, Y.S. et al. Bluetongue virus: comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, immunodiffusion, and serum neutralization for detection of viral antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, v.15, n.1, p.159-162, 1982.

SHRINGI, S.; SHRINGI, B.N. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. *J. Vet. Sci.*, v.6, n.1, p.77-79, 2005.

SILVA, J.A.; MODENA, C.M.; MOREIRA, E.C. et al. Frequência de febre aftosa, língua azul e leucoseenzótica bovina em caprinos de diferentes sistemas de produção no estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.40, n.6, p.393-403, 1988.

THRUSFIELD, M. (Ed.). *Veterinary Epidemiology*. 3ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 624p.

VAN DER SLUIJS, M.V.D.; TIMMERMANS, M.; MOULIN, V. et al. Transplacental transmission of Bluetongue virus serotype 8 in ewes in early and mid gestation. *Vet. Microbiol.*, v.149, p.113–125, 2011.

ZAR, J.H. (Ed.). *Biostatistical analysis*. 4ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 662p.

Capítulo IV

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

Artigo enviado para publicação no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira* de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular³

Maria L.C.R. Silva⁴, Roberto S. Castro⁵, Rita C. Maia³, Sergio A. Nascimento³, Ana Lisa V. Gomes³ e Sérgio S. Azevedo²

ABSTRACT.- Silva M.L.C.R, Castro R.S., Maia R.C., Nascimento S.A., Gomes A.L.V. & Azevedo S.S. 2012. [Lentivirus in dairy goats from semiarid of Paraíba state: antibody prevalence, risk factors and molecular detection]. Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, PB. 58700-000, Brazil. E-mail: ssazevedo@cstr.ufcg.edu.br

The aim of this study was to determine the prevalence of dairy goats seropositive to small ruminant *Lentivirus* infection in the semiarid of the Paraíba state, Northeastern Brazil, to identify risk factors associated with the flock-level prevalence and to perform molecular detection of the agent. A total of 1,047 dairy goats from 110 flocks were randomly selected from the county of Monteiro, Paraíba state, during March 2009 to December 2011. For the diagnosis of *Lentivirus* infection, the agar gel immunodiffusion test (AGID) and real-time PCR for blood and milk were carried-out. Prevalences of positive flocks and seropositive animals at AGID were 44.6% (95% CI = 35.1% - 54.3%) and 8.1% (95% CI = 5.6% - 16.8%), respectively. Cutting and disinfection of the navel (odds ratio = 2.44; p = 0.048) and existence of good quality fences (odds ratio = 3.45; p = 0.048) were identified as risk factors. Real-time PCR for white blood cells had good performance, with sensitivity of 100%, specificity of 92.86%, concordance of 93.75% and Kappa index of 0.765. It is suggested that a health education work be made with the owners in order to encourage them to adopt prevention measures, especially with regard to cleaning and disinfection of the premises and cutting and disinfection of the navel, aiming to reduce the spread of the infection in the flocks.

INDEXING TERMS: small ruminants, *caprine arthritis-encephalitis*, seroepidemiology, real-time PCR

³ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

⁴ Universidade Federal de Campina Grande, 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

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

RESUMO.- O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de caprinos leiteiros soropositivos para a infecção por *Lentivirus* de pequenos ruminantes no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, identificar 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*, foram utilizados os testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e PCR em tempo real do sangue e do leite. As prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos na IDGA foram de 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; *p* = 0,048) e existência de cercas de boa qualidade (*odds ratio* = 3,45; *p* = 0,048) foram identificados como fatores de risco. A PCR em tempo real da série branca do sangue 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 no sentido de encorajá-los acerca da condução de medidas de prevenção, principalmente no tocante à limpeza e desinfecção das instalações e corte e desinfecção de umbigo, com o objetivo de reduzir a disseminação da infecção nos rebanhos. TERMOS DE INDEXAÇÃO: pequenos ruminantes, artrite-encefalite caprina, soroepidemiologia, PCR em tempo real

INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) compreendem o vírus da artrite encefalite caprina e o vírus Maedi-Visna, relacionados antígenicamente e fenotipicamente, pertencentes ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae* (Valas et al. 2000). A maioria dos casos de infecção por LVPR cursa de forma subclínica (Costa et al. 2007), causando perdas econômicas decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira, falhas reprodutivas, predisposição da glândula mamária à 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 articular, reprodutivo, respiratório, mamário 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 digestiva, pela ingestão de colostro e leite contaminados (Guedes et al. 2001).

O diagnóstico laboratorial da infecção por LVPR é baseado primariamente na detecção de anticorpos contra proteínas estruturais dos vírus, e nesse contexto a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) 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,

existência de animais que não desenvolvem resposta humoral e interferência de anticorpos colostrais em animais jovens. 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 LVPR 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 demonstraram 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, o objetivo do presente trabalho foi 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.

MATERIAIS 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 delimitada 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, 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 agar (IDGA) 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 IDGA.

Um ano após a realização da IDGA, foram selecionadas 16 propriedades que apresentaram animais soropositivos, com colheita de sangue e leite de 179 fêmeas adultas. Foi realizada IDGA nos soros, e PCR em tempo real na série branca do sangue e leite. O sangue heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 g 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 1500 g por 10 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de PBS e congelado a -20°C para posterior extração do DNA com o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) (Brinkhof et al. 2008).

A colheita das amostras de leite foi realizada após assepsia do úbere do animal, sendo colhida amostra de 10 mL em tubo Falcom de 15 ml e refrigerada imediatamente, com processamento antes de completar seis horas após a colheita. O leite foi centrifugado por 10 minutos a 1500 g a 4°C. Após centrifugação, foi removida a camada de gordura e o soro, e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de PBS. O material foi transferido outro tubo e adicionou-se 9 mL de PBS, com posterior centrifugação por 10 minutos a 1500 g a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de PBS e congelado a -20°C para posterior extração do DNA com o kit QIAamp DNA Mini Kit (Brinkhof et al. 2010).

Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

Para o diagnóstico sorológico, foi utilizado o microteste de imunodifusão em gel de ágar (micro-IDGA), de acordo com a orientação do fabricante. O teste foi realizado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 16 mL 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 (10 µL), enquanto que nos poços periféricos foram adicionados, de forma alternada, soro padrão positivo (10 µL) 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).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real

Para o diagnóstico molecular, antes da realização da extração de DNA, as amostras foram agitadas em vórtex por 15 segundos, e em seguida foi executado o protocolo de extração com o kit QIAamp DNA Mini Kit.

A PCR em tempo real (qPCR) foi executada no termociclador *line - Gene K* (Bioer), 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'-CGAGCCACCGCGGTCATACG-3'. A reação foi composta por 12,5 µL do master mix syber green (Qiagen), 20 pmol de cada primer, 2 µL da DNA da amostra e 6,5 µL de dH₂O, totalizando 25 µL por microtubo. Após resultado positivo no *housekeeping* realizou-se a qPCR específica para lentivirose, com os primers CF2 5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' e CR2 5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3', que foram construídos a partir do gene *gag*, amplificando um fragmento de 185bp (Rimstad et al. 1993). As condições da reações 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 CAE a amostra CAEV COR K e para Maedi-Visna a amostra K 1514, isoladas de cultivo celular Cor FC, cujo DNA foi extraído na quantidade de 0,15 ng/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 IDGA e PCR em tempo real da série branca 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 de 110 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 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 LVPR 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, utilizaram 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% - 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% na 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 para 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 LVPR ocorre com maior frequência em caprinos com mais de um ano de idade e a prevalência aumenta a partir de três anos (Rowe et al. 1992, Greenwood et al. 1995, Al-Qudah et al. 2006).

Na análise univariável para os fatores de risco, as variáveis associadas ($p \leq 0,20$) à prevalência de focos de LVPR foram (Quadro 1): 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. Na análise multivariável, foram identificados os seguintes fatores de risco (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, a presença de cercas de boa qualidade como fator de risco pode estar relacionada 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 lentivírus por contato prolongado com secreções de animais infectados (Greenwood et al. 1995, Guedes et al. 2001). Dessa maneira, a existência de cercas de boa qualidade não deve ser encarada como um fator de risco, e sim as possíveis condições de alta concentração de animais. Um sugestão para a correção desse possível fator de risco seria concentrar esforços nas atividades de limpeza e desinfecção das instalações com o objetivo de diminuir a carga viral no ambiente.

A prática de corte e desinfecção de umbigo também foi apontada como fator de risco, o que pode estar relacionado com a realização inadequada desse procedimento, ou seja, sem os devidos cuidados higiênicos, possibilitando a transmissão horizontal do agente por contato com secreções e excreções de animais infectados (Callado et al. 2001).

Na segunda etapa do trabalho, dos 179 caprinos utilizados oito animais procedentes de quatro propriedades foram soropositivos. Foi realizada PCR em tempo real na série branca do sangue e no *pellet* do leite das 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 na IDGA, PCR da série branca do sangue 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 da série branca do sangue 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, leva-se em consideração os custos, a viabilidade e as características individuais do teste. No presente trabalho, foi feita associação da IDGA, teste indireto para detecção de anticorpos, com a PCR em tempo real, teste direto para detecção de DNA. A PCR em tempo real aumenta a eficácia na detecção de animais infectados, pois detecta falsos-negativos na IDGA. Além de melhorar a sensibilidade do diagnóstico de LVPR, evidencia o processo virêmico que pode ocorrer em infecções naturais e na ausência de resposta imunitária humoral detectável pela IDGA. 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 IDGA, utilizando amostras de sangue heparinizado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a infecção por lentivírus, revelada por detecção de anticorpos e PCR de sangue e leite, está presente 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 a disseminação da infecção 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, e 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 piauienses. *Cienc. Vet. Trop.* 7(2-3):75-81.
- 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 de agosto de 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
- Brinkhof J.M.A., Van Maanen C., Wigger R., Peterson K. & Houwers D.J. 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 147:338-344.

- 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. *Arq. Inst. Biol.* 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.
- 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.
- 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, Brazil. *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 de fevereiro de 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. *Cienc. 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 vírus 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 vírus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.* 53(12):2386-2395.
- 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.

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	96	41 (42,7)	
Extensiva	7	3 (42,9)	0,270
Tipo de exploração			
Cria	80	33 (41,3)	
Recria/engorda	7	5 (71,4)	
Reprodução	5	3 (60,0)	
Subsistência	6	1 (16,7)	0,195*
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
Existência de 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 de monta controlada			
Não	107	48 (44,9)	
Sim	3	1 (33,3)	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 ($p \leq 0,20$)

Quadro 2. Fatores de risco com a condição de propriedade positiva para a infecção por *Lentivirus* em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil

Fatores de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	p
Realizar corte e desinfecção de umbigo	2,44	1,01 – 5,88	0,048
Existência de 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 IDGA, PCR em tempo real da série branca do sangue (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
	+	-					
IDGA	+	4	66,67 (22,28 – 95,67)	90,48 (77,38 – 97,34)	87,50 (74,75 – 95,27)	0,500 (0,156 – 0,844)	0,6831
	-	2					
PCR-sangue	+	6	100 (54,07- 100)	92,86 (80,52 – 98,50)	93,75 (82,8 – 98,69)	0,765 (0,514- 1,000)	0,2482
	-	0					
PCR-leite	+	5	83,33 (35,88 – 99,58)	85,71 (71,46 – 94,57)	85,42 (72,24 – 93,93)	0,509 (0,204 – 0,813)	0,1306
	-	1					

^a Positividade em pelo menos dois testes

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho, foi possível determinar a situação epidemiológica de agentes virais em rebanhos de caprinos de uma importante bacia leiteira em nível de Brasil, com base em amostragem planejada, bem como foi possível sugerir medidas de prevenção e controle com base nos resultados obtidos.

Ficou constatado que há evidências de circulação de CpHV-1, BoHV-1 e BoHV-2, bem como o procedimento de monta natural foi associado com aumento da prevalência para CpHV-1. Sugere-se o encorajamento da adoção de serviços veterinários e de programa de vigilância ativa dos rebanhos em risco com o objetivo de reduzir a prevalência dessas infecções

A baixa ocorrência de caprinos soropositivos para *Pestivirus* levanta a necessidade de investigações voltadas para a identificação de animais PI, uma vez que, na região Nordeste, a criação consorciada de bovinos e pequenos ruminantes é prática amplamente utilizada, o que pode facilitar a transmissão viral entre as espécies, embora o contato com bovinos não tenha sido identificado como fator de risco no presente trabalho.

A elevada prevalência de propriedades com animais soropositivos para do vírus da língua azul demonstra a circulação do vírus em rebanhos de caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba. Com base na análise de fatores de risco, sugerem-se maiores cuidados na concentração de animais no tocante ao controle de vetores, bem como utilização de materiais descartáveis nos procedimentos de corte e desinfecção de umbigo.

A infecção por lentivírus, revelada por detecção de anticorpos e PCR de sangue e leite, está amplamente 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, principalmente no tocante à limpeza e desinfecção das instalações e nas práticas de corte e desinfecção de umbigo, com o objetivo de reduzir a disseminação da infecção nos rebanhos.

ANEXOS

ANEXO 1



**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL CAMPUS DE PATOS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA VETERINÁRIA**

NORMA Nº 01/2011

Altera a NORMA Nº 01/09 de 04 de fevereiro de 2009 e acrescenta novos critérios para a elaboração e defesa da dissertação e tese do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no uso de suas atribuições, de conformidade com a legislação em vigor, e nos termos da Resolução Nº 13/02 do CONSEPE e do seu Regulamento.

RESOLVE:

Art. 1º Decide modificar a redação do § 1º do art. 2º da norma 01/2009 e estabelece que o aluno deva apresentar, antes da defesa, o comprovante de submissão dos trabalhos da dissertação e tese às revistas Qualis A1, A2, B1 e B2 da CAPES.

§ 1º - O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois, e poderão ser da seguinte forma:

I - uma revisão da literatura e um trabalho já enviado a uma revista científica Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos enviados à revista Qualis citadas no Caput do artigo.

§ 2º - O corpo da tese poderá ser constituído por:

I - três trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo e uma revisão da literatura.

§ 3º Os demais itens relacionados com a elaboração da dissertação deverão seguir as normas no Anexo.

Art. 2º A qualificação do doutorado deverá ser feita em um prazo de 30 (trinta) meses após o ingresso do doutorando no Programa.

Art. 3º A presente Norma entra em vigor a partir da data de sua publicação.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

Anexo

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE
O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois: 1- Revisão da literatura e 2- um trabalho nas normas da revista científica Qualis A ou B da CAPES o qual será enviado, obedecendo ao prazo máximo de 30 dias após a defesa.
Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, um título que abranja os dois artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos.
O trabalho será redigido seguindo as normas da revista para a qual será enviado.
A revisão da literatura, se não tiver sido enviada para outra revista, deve seguir as mesmas normas que o trabalho a ser enviado, deverá ser incluída versão em inglês e português.
Se a dissertação constar de mais de um trabalho original, estes deverão seguir as normas das respectivas revistas para as quais serão enviados.
Em todos os casos, no final da dissertação devem ser incluídas, como anexo, as normas da (s) revista (s) para as quais os trabalhos serão enviados. Para a formação da dissertação, será utilizada a folha A4. O estilo da fonte deve ser Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 entre as linhas.
Na capa será incluído o nome da instituição, abaixo o título, ao lado direito a descrição da dissertação sem constar a área, abaixo o nome do mestrando e por último o nome da cidade, Estado e data.
A contracapa será constituída da mesma forma da capa, acrescentando-lhe apenas o nome do orientador e no verso, a ficha catalográfica.
No caso do aluno optar pela apresentação deverá ser incluída uma introdução com uma explicação dos dois trabalhos.
No final, após o último capítulo deverão ir as conclusões do (s) trabalho (s).
Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da dissertação deve ser incluído, à direita da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final.
O sumário será antes da introdução.
As Figuras, Tabelas ou Quadros devem ser incluídos dentro dos resultados, em folhas separadas, com não mais de 4 Figuras, Quadros ou Tabelas por folha.
Um volume deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.
Cinco exemplares da dissertação devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa.
Após a defesa o mestrando deverá entregar na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da dissertação, com pelo menos 2 (duas) em capa dura, no prazo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica.
Na versão final da dissertação não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista, mas somente a cópia do trabalho em português. No anexo deverá constar uma folha mencionando o site da revista em que o artigo será publicado. Deverá ser entregue na Coordenação em separado uma cópia do artigo escrito em inglês, com as devidas correções da banca, a ser enviado para publicação.
Agradecimentos e dedicatórias serão optativos.
Entregar uma cópia em CD da dissertação e/ou tese em pdf em um único arquivo. Deverá ser idêntico à versão impressa. Não será aceito a dissertação em mais de um arquivo.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

ANEXO 2



Serological evidence and risk factors associated with *Caprine herpesvirus 1* in dairy goat flocks in a semiarid region of northeastern Brazil

Maria L. C. R. Silva, Edviges M. Pituco, Adriana H. C. Nogueira, Maira S. N. Martins, Michele S. Lima, Sérgio S. de Azevedo¹

Abstract. A cross-sectional study was carried out to determine the flock-level seroprevalence of *Caprine herpesvirus 1* (CpHV-1) and *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) and 2 (BoHV-2) and risk factors associated with CpHV-1 in dairy goat flocks from a semiarid region of northeastern Brazil. A total of 1,034 serum samples from 110 flocks were collected from March 2009 through March 2010. A structured questionnaire focusing on variables related to risk factors for CpHV-1 infection was given to each farmer at the time of blood collection. Antibodies against CpHV-1, BoHV-1, and BoHV-2 were detected by neutralization tests. The flock-level prevalences of CpHV-1, BoHV-1, and BoHV-2 were 89.1% (98/110; 95% confidence interval [CI]: 81.7–94.2), 80% (88/110; 95% CI: 71.3–87), and 4.5% (5/110; 95% CI: 1.5–10.3), respectively. Frequencies of seropositive animals were 36.6% (379/1,034), 25.8% (267/1,034), and 0.6% (6/1,034) for CpHV-1, BoHV-1, and BoHV-2, respectively. The use of natural mating was identified as a risk factor associated with CpHV-1 flock-level prevalence ($P = 0.001$). It is suggested that adoption of veterinary services and active surveillance of the at-risk flocks in the study region should be initiated to reduce the prevalence of herpesvirus infections.

Key words: Brazil; flock-level risk factors; goats; herpesviruses; small ruminants.

ANEXO 3

Instructions to Authors Journal of Veterinary Diagnostic Investigation – Revised January 27, 2012

The stringency of the review process in the *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* has recently increased, resulting in a reduced acceptance rate. Consequently, some types of manuscripts that were hitherto acceptable in the *Journal* are no longer acceptable. It is strongly advised that authors review the following instructions carefully, as failure to do so may result in immediate rejection or delay in the reviewing and/or publication of submitted papers.

1. Scope and editorial policy

The *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (J Vet Diagn Invest) is an international peer reviewed journal published in English by the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). The *Journal* is devoted to all aspects of veterinary diagnostic science including the major disciplines of anatomical pathology, bacteriology/mycology, clinical pathology, epidemiology, immunology, laboratory information management, molecular biology, parasitology, public health, toxicology, and virology.

1.1. Copyright considerations

The *Journal* accepts original manuscripts for consideration with the understanding that the same material or a substantial part thereof is not presently being considered for publication or has not been published elsewhere. The Corresponding Author should secure the approval of all authors and institution(s) where the work was carried out. A statement to the Editor confirming that such approval has been received should be included in the submission cover letter.

Upon acceptance for publication, authors will receive a link to the **Contributor Form** to transfer copyright or other suitable arrangement to the publisher. All articles published in the *Journal* are protected by copyright that covers the translation rights as well as the exclusive rights of the AAVLD to reproduce and distribute the articles. The *Journal* will not publish any manuscript for which the signed Contributor Form has not been submitted.

If your manuscript incorporates any previously copyrighted material not in the public domain, you must obtain a written reprint permission from the copyright owner and submit a scanned PDF of the permission along with your manuscript files via our online manuscript submission portal (see section 5). No manuscript containing

previously copyrighted material will be accepted for review in the *Journal* without submission of satisfactory proof that copyright permission has been obtained.

1.2. Ethical considerations: plagiarism

The United States Office of Research Integrity (ORI) defines plagiarism as “copying a portion of text from another source without giving credit to its author and without enclosing the borrowed text in quotation marks” (Avoiding plagiarism, self-plagiarism, and other questionable writing practices: A guide to ethical writing by Miguel Roig, PhD, St. Johns University). Authors are encouraged to visit the ORI website below for a more complete discussion of plagiarism (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/>).

Detection of plagiarized material in any manuscript will result in its immediate rejection, regardless of its scientific merit.

1.3. Fees

There is a manuscript-processing fee of \$75 for each printed page published in the *Journal*. This fee also includes black/white photos in the print version and color figures online (if color figures are submitted). Upon acceptance for publication, the corresponding author will receive a **Color Figure Agreement**. If your article contains **color** figures and you wish to pay the additional fee for the figures to appear in color 2 of 8 in print, you are required to fill out and return this form to verify that you are aware of the additional charges (\$800 per page and \$200 for every additional page) in the print version.

2. Review and acceptance criteria

Manuscripts will be reviewed by 2 or more persons selected by the Editors on the basis of their expert knowledge and/or experience in the subject matter. To be acceptable for publication in the *Journal*, manuscripts must have a clear focus on laboratory diagnostic science in any of the disciplines listed above. Review and acceptability criteria include, but are not limited to, the following:

2.1. Adequacy of format, style, and language (see section 3.1)

2.2. Novelty of the contents and their impact/usefulness to veterinary laboratory diagnosticians

2.2.1. Novelty. The *Journal* is devoted to the publication of **original** work. It is the responsibility of all authors to review the literature to ensure that work similar to their own has not been previously published before submitting a paper for review. Authors should take note of the following examples:

- The development of diagnostic assays (notably PCR procedures) for pathogens that have previously been published in the literature: the *Journal* will consider these papers if it can be demonstrated that the submitted manuscript constitutes a significant improvement over previously published methodology. Please note that if 1 or more previously described PCR procedures for any given pathogen exist, subsequent submissions will be acceptable for publication only if the authors demonstrate equivalency (or preferably superiority) via a side-by-side comparison between the existing assay and the new assay. The manuscript must also assess important test-related criteria such as sensitivity, specificity, accuracy, robustness, rapidity, throughput, and cost.
- The isolation and/or identification of infectious agents from host species that have previously been described in the literature will be considered if the submitted paper adds impactful new information, such as new diagnostic method, novel virulence or pathogenicity data, or unique antibiotic susceptibility information. In contrast, the detection of a well-known pathogen in a new animal species is not considered sufficiently novel information to warrant publication unless there is impactful information as stated in the preceding sentence.
- Single case reports will be considered for publication only if they demonstrate excellence in the diagnostic investigation, including a detailed discussion on the differential diagnosis. However, preferred submissions would be novel, emerging, or unique case reports; case series summaries; classic diseases that have significantly evolved or changed in some fashion; or demonstration of the usefulness of new technologies to the diagnostic process.

2.2.2. Usefulness and impact. The target readership of the *Journal* is veterinary laboratory diagnosticians. The contents of manuscripts published in the *Journal* must be applied science in nature and relevant to the professional activities of this core group. Examples of manuscripts that do not fit within the scope of the *Journal* include the following:

- Clinically oriented manuscripts regarding therapy and clinical diagnostic techniques (e.g., ultrasonography, radiology).
- Basic science manuscripts (e.g., mapping genes of infectious agents without a practical diagnostic application)

2.3. Adequacy of the experimental design

3 of 8 The experimental design used should be appropriate and adequate. Similarly, the interpretations and conclusions should be valid and supported by statistics where appropriate.

2.4. Adequacy of the title, references, figures, and tables

The title should adequately reflect the contents of the manuscript. References must be as current and complete as possible, but the use of multiple references to back up a single fact should be avoided. All figures and tables should be pertinent to the contents of the manuscript and should not be redundant with information already presented in the text.

3. Manuscript preparation

3.1. General format and style

3.1.1. Layout and media. Four manuscript formats are accepted: Review Articles, Full Scientific Reports, Brief Research Reports, and Case Reports. Review Articles are strongly encouraged provided they cover subjects of current and broad interest to veterinary laboratory diagnosticians. Authors interested in submitting a Review Article should contact the Editor-in-Chief (editor@jvdi.org). Book Reviews are also welcome and should be emailed to the Editor-in-Chief and not submitted through SAGE Track.

- Your main document must be in .doc, .docx, or .rtf format.
- Main document must include your tables but **must not** include embedded figures.
- Pages must be numbered at the bottom center.
- Text lines must be numbered; each page should begin with line #1.
- Manuscript must be double-spaced *throughout* using Times New Roman; font size should be 12 pt.
- Figures must be submitted in .tiff format only.
- Line art must be submitted at a minimum of 1,200 pixels/inch (480 p/cm). Half tones (photographs)

must be submitted at a minimum of 300 pixels/inch (120 p/cm). For help preparing your figures, visit <http://www.irfanview.com/>.

- Any supplemental data should be submitted in .pdf format.
- Submit all parts of the manuscript via SAGE Track at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

3.1.2. Language and style. The American form of English must be used, and manuscripts must be written in a style following the current standards for scientific publications. The Editors will reject manuscripts

that do not meet a minimum standard for written English. The use of personal and possessive pronouns (I, his/hers, my, our, their, we, us) should be avoided in the text. Only metric units of measurement are acceptable. Abbreviations may be used after first mention with complete spelling. Arabic numerals must be used except when a number begins a sentence, in which case it must be spelled out in full. Centrifugal speed should be expressed in Relative Centrifugal Force (RCF) and not in revolutions per minute (RPM).

3.2. Detailed layout

3.2.1. Title page. Page 1: Full title of the paper, the authors' full names (e.g., John D. Doe); the name and location of each author's institution(s); the name, mailing address, and e-mail of the corresponding author; and a short running title not to exceed 60 characters (including spaces).

3.2.2. Abstract. Page 2: Abstract must be limited to **250 words or less** and written as a single paragraph. It should be factual and concise, yet complete enough to be able to stand alone without reference to the text.

Abbreviations and reference citations must not be used in the abstract. 4 of 8

3.2.3. Key words. Page 2: For online search purposes, provide an **alphabetical** list of key words or phrases not to exceed 80 characters (including spaces). Key words should appear directly below and on the same page as the abstract. *Abbreviations should be spelled out.* During online submission, SAGE Track limits the number of key words that can be submitted. This has no bearing on the list included in your manuscript.

3.2.4. Body of manuscript. Beginning on Page 3.

- *Review Articles* should contain the following: Title page, Abstract and Key words, Introduction, section headings, Acknowledgements (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any). *Review articles should have appropriate section headings and subheadings chosen by the author.*

- *Full Scientific Reports* should contain the following: Title page, Abstract and Key words, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any). *Introduction and Discussion should not contain any subheads.*

- *Brief Research Reports* and *Case Reports* should contain the following: Title page, Abstract and Key words, body of manuscript (*no section or subheadings*),

Acknowledgements (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any). Articles should be limited to approximately 12 double-spaced typed pages, including tables and references.

3.2.5. Sources and manufacturers. *Trade names for commercial test kits, equipment, chemicals, etc., should not be included in the text but should be listed in full with the appropriate text citation in the Sources and Manufacturers section.* Generic names of drugs should be used in the text. In the text, sources should be designated by superscript lowercase letters in sequential order. Under the Sources and Manufacturers heading, sources (including manufacturer's name, city, state, and country if other than the U.S.) should be cited in a lettered list to correspond to superscript letters in the text.

3.2.6. Declaration of conflicting interests. Please identify any potential conflict of interest before manuscript submission. Such information will not alter established editorial and review policies, but will assist the editorial staff in avoiding any potential conflicts that could give the appearance of a biased review. If no conflicting interests exist, please use the following text: *The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.*

3.2.7. Funding. Please disclose any funding sources, as well as grant numbers. If no outside funding was used, please use the following text:

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

3.2.8. References. In the text, references should be identified numerically with superscript numbers placed after the punctuation mark. *Names of authors should not be used in the text.*

Examples:

Recent studies^{1,3,5-7} have shown....

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as previously described.^{6-8,9,10}

In the Reference list, references must be listed alphabetically (according to authors' last names) and numbered consecutively. List all authors when there are 4 or fewer; when there are 5 or more authors, list the first 3 and add "et al." Volume numbers *only* should be used for journals, unless each journal issue 5 of 8

begins with page 1, in which case the issue number should appear in parentheses after the volume number.

Journal names should be abbreviated per NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>).

Examples:

1. Bowen RA: 1987, Serologic responses of calves to sequential infections with epizootic hemorrhagic disease virus. *Am J Vet Res* 48:1449–1452.
2. Gustafson DP: 1986, Pseudorabies. *In: Diseases of swine*, ed. Dunn HW, 5th ed., pp. 274–289. Iowa State University Press, Ames, IA.

For references in a language other than English, provide an English translation of the title in brackets following the original language title. Add the language in which the article appears at the end of the reference (e.g., In German.). If the article has an abstract that is available in English, please also state this (e.g., In German. Abstract in English.).

Example:

Eicken K, Frey H-R, Grummer B, et al.: 2004, Epidemiologische Langzeituntersuchungen und Überwachungsmaßnahmen zur Bekämpfung von BVD-Virus infektionen in einem nordwestdeutschen Rinderzuchtbetrieb.- Ein Fallbericht [Epidemiological long-term investigations and monitoring for the control of BVD virus infections in a northwestern German cattle holding]. *Der Praktische Tierarzt* 85:350–355. In German.

Authors are responsible for the accuracy of all references. Only published material or accepted manuscripts should be listed in references. **URLs, personal communications, unpublished observations, dissertations, abstract-only citations, meeting/conference/workshop proceedings, and citations from other non-refereed publications are not acceptable references; they must be cited in the text within parentheses.** In general, meeting proceedings and citations from other non-refereed publications should be avoided.

3.2.9. Tables. Tables should appear on separate pages following the References. The table title should appear directly above the table. Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals, and must be cited consecutively in the text. All abbreviations must be spelled out using table footnotes. References to footnotes should be indicated by the following sequential symbols (*, †, ‡, §, |, #, ¶, **).

3.2.10. Figure legends. Legends should appear on a separate page following the tables, and should be cited consecutively in the text. Identify histological stains and indicate the magnification on electron micrographs with a scale bar in the figure and an explanation in the legend (e.g., Hematoxylin and eosin. Bar = 20 µm.).

3.3. Figures

It is strongly advised that authors review the following instructions carefully, as failure to submit figures in the required format and resolution will result in immediate rejection. Figures must NOT be embedded in the text document. Figures must be cited consecutively in the text and numbered with Arabic numerals (Fig. 1, Fig. 2, etc.). Simple illustrations should be designed for one column. Complicated illustrations should be designed to reproduce in two columns.

- 1-column width is 20 picas or 3.320 inches.
- 2-column width is 41 picas or 6.807 inches.

Acceptable format is .tiff.

- minimum acceptable resolution is 300 pixels/inch (120 pixels/cm) for half tones (i.e., photographs)
- minimum acceptable resolution is 1,200 pixels/inch (480 pixels/cm) for line art (i.e., graphs, charts)

Figures must be submitted UN-flattened to allow for editing if needed. Black/white figures should be saved as grayscale. Multiple color figure panels should be grouped into a composite figure, with the individual panels clearly identified (i.e., **A, B, C**). Figures should be saved as separate files with the figure number (Fig. 1, Fig. 2, Figs 3-5, etc.) as the file name (*figure numbers and/or titles should not appear as part of the image*).

Authors are responsible for paying the cost of publishing **color** figures in the print version at the rate of **\$ 800.00 per page and \$200 for every additional page**. Black/white images do not incur any additional cost. See section 1.3 for information on online-only color submission.

4. Page charges and galleys

There is a manuscript-processing fee of \$75 for each printed page published in the *Journal*. Color figures incur an additional charge of \$800 for the first page and \$200 per additional page if you wish to pay the color figure charges for the print version. You must let us know by filling out and returning the **Color Figure Agreement** to the Editorial office via email (editorial@jvdi.org).

The Corresponding Author will receive galley proofs by e-mail from the Production Editor (allison.leung@sagepub.com) 8–10 weeks before the first day of the scheduled publication month. At the time galleys are sent, an invoice for page charges will also be attached, and payment is expected **WITHIN 30 DAYS**.

5. New manuscript submission

All manuscripts must be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi> using the following online submission instructions.

5.1. Preparing to submit

1. To ensure your browser is supported by SAGE Track, please visit:

http://ssl.salesforce.com/_ui/selfservice/pkb/PublicKnowledgeSolution/d?orgId=00D000000008YVy&id=501000000006EPM

2. Name your files using simple file names and avoid special characters and spaces.

5.2. Submission process

1. Go to the SAGE Track home page at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

2. If you have previously submitted or reviewed a manuscript using SAGE Track, use your **User ID** and **Password** to log in.

3. If you have forgotten your User ID and Password, enter your e-mail address to receive an e-mail with your account information.

4. If you are not registered, click on the “Create Account” tab in the upper right-hand corner of the home page and follow the on-screen instructions.

5. Click on the **Author Center**, find the button and click to **submit a new manuscript**, then follow the on-screen instructions. It is useful to have the original text file open so that you can copy and paste into the required fields. You can provide e-mail addresses for up to 20 of your co-authors. *Please note:* the system only allows up to 20 accounts per manuscript. While SAGE Track only allows you to list 20 authors, this does **not** have any bearing on the number of authors you may list on your title page. The system will create accounts for the co-authors you list, thereby allowing them to log in and check the manuscript status. 7 of 8

6. If at any step you need to stop the submission process, click on the “Main Menu” link. Everything you have typed into the system will be saved, and the partially completed submission will appear under “Unsubmitted Manuscripts” in your “Author Center.” To return to the submission process you will need to click on the “Continue Submission” button next to the relevant manuscript title.

7. File upload:

- Enter individual files using the **Browse** button.
- Select the appropriate **File Designation** type (e.g., Main Document, Figure) from the pull-down menu. Choose **Main Document** for your manuscript text file. Choose **Figure** for all illustrations; a confirmation window will appear and you will be prompted to

provide a **File Tag** and a **Figure legend** for each figure. The File Tag should be Figure 1, Figure 2, etc. Cut and paste the figure legend from your text file. If you do not want a document to be included as part of the consolidated PDF used for peer review, please designate it as a **Supplementary File**.

- Upload your files by clicking on **Upload Files**. This may take several minutes. Repeat these steps until you have uploaded all your files.
- Once you have uploaded all files, indicate the **Order** in which they should appear in your paper using the drop-down menu to the left of the file names. Then click **Save**.
- Click on **PDF** to view your files in PDF format. This PDF will be used for peer review.
- If the files have not uploaded to your satisfaction, click **Save and Go Back** to return to the file upload screen where you can remove or redo the order of the files, and repeat the upload process.

8. When you are satisfied with the PDF, click **Save and Continue**. SAGE Track will check that you have completed all the mandatory fields and that you have viewed the PDF. It will also present you with a summary of all the information you have provided and give you a final chance to edit it. When you have finished reviewing this information click **Submit**.

9. After the manuscript has been submitted you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been successfully submitted. *This email will include the assigned manuscript number that will be used in all correspondence.* If you do not see a confirmation screen and/or receive a confirmation e-mail, your manuscript has not been successfully submitted to the *Journal* and cannot progress to peer review. If this is the case, your manuscript will appear in the “Unsubmitted Manuscripts” section of your “Author Center” awaiting your attention. Please contact SAGE Track’s customer support (434-817-2040, ext. 167) or the Editorial Assistant at editorial@jvdi.org if you encounter problems submitting your manuscript.

10. If you return to the **Author Center**, click on **Submitted Manuscripts** to the left of your screen. Find your manuscript title, and locate the **Status** section. This provides information on your manuscript as it moves through the review process.

6. Revised manuscript submission

1. Go to the SAGE Track home page at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

2. Use your **User ID** and **Password** to log in.
3. Click on **Author Center**, then **Manuscripts with Decisions**.
4. Locate the manuscript you wish to revise and click **Create a Revision**.
5. Respond to the comments made by the Editor and/or Reviewers. *Important:* All corrections/changes must be detailed in your response to reviewers.
6. Follow the submission process, providing information when prompted.
7. If at any step you need to stop the revised submission process, click on the “Main Menu” link. Everything you have typed into the system will be saved. When you interrupt the revision submission process, your manuscript moves into the “Revised Manuscripts in Draft” in your “Author Center.” Click on the link to restart your revision process.
8. Please note that all files from your new manuscript submission process are retained by SAGE Track. Therefore, when uploading your revised files, you must first *delete* your original files and replace them with revised versions.
9. After your revision has been submitted you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been successfully revised. This email will include an appended manuscript number (.R1, .R2) that will be used in all correspondence.

7. Help

If you experience any problems during the online submission process, please consult the SAGE Track online guide (<http://mchelp.manuscriptcentral.com/gethelpnow/index.html>), which provides detailed submission instructions. Alternatively, contact the Editorial Assistant at editorial@jvdi.org.

ANEXO 4

Diretrizes para Autores Semina: Ciências Agrárias

Taxa de Submissão de novos artigos: R\$ 50,00

A Taxa de Publicação (trabalhos aprovados) será de acordo com o número de páginas do manuscrito: Até 9 páginas: R\$ 150,00; De 10 a 15 páginas: R\$ 200,00; De 15 a 19 páginas: R\$ 250,00; De 20 a 25 páginas: R\$ 300,00

O **comprovante de depósito** deverá ser digitalizado e anexado no sistema como documento suplementar. Depósito em nome do ITEDES

Banco do Brasil (001)

Agência: 1212-2; Conta corrente: 43509-0

Caixa Econômica Federal (104)

Agência: 3076; Conta corrente: 0033-4

Itaú (341)

Agência: 3893; Conta corrente: 29567-9

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos submetidos em inglês terão prioridade de publicação.

O texto em **inglês** dos artigos aceitos para publicação deverá ser submetido à correção do American Journal Experts. O autor principal deverá anexar no sistema **documento comprobatório** dessa correção.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português, inglês ou espanhol, no editor de texto Word for Windows, com espaçamento 1,5, em papel A4, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem estar separadas no final do trabalho.

As figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões. As legendas das figuras deverão ser colocadas em folha separada obedecendo à ordem numérica de citação no texto. Fotografias devem ser identificadas no verso e desenhos e gráfico na parte frontal inferior pelos seus respectivos números do texto e nome do primeiro autor. Quando necessário deve ser indicado qual é a parte superior da figura para o seu correto posicionamento no texto.

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras); Abstract com Key words (no máximo seis palavras); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final ou Resultados, Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser escritos em letras maiúsculas e minúsculas e destacados em negrito, sem numeração. Quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem receber números arábicos. O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo de congresso, nota prévia ou formato reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. *Título do trabalho*, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. *Resumo e Palavras-chave*: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 150 e um máximo de 300 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).
3. *Introdução*: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.
4. *Material e Métodos*: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.
5. *Resultados e discussão com conclusões ou Resultados, Discussão e Conclusões*: De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.
6. *Agradecimentos*: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Quando for o caso, antes das referências, deve ser informado que o artigo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biosegurança e ética.

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos: Deverá obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

7. *Citações dos autores no texto*: Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmam que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et. al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com três autores

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula.

Ex: (RUSSO; FELIX; SOUZA, 2000).

Incluídos na sentença, utilizar virgula para os dois primeiros autores e (e) para separar o segundo do terceiro.

Ex: Russo, Felix e Souza (2000), apresentam estudo sobre o tema....

Citações com mais de três autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Observação: Todos os autores devem ser citados nas Referências Bibliográficas.

8. *Referências Bibliográficas:* As referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes (única exceção à norma – item 8.1.1.2). A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porem, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologia completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a seqüência – introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, achados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os colaboradores poderão ser convidados a apresentar artigos de interesse da revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.
2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).
3. Os trabalhos não aprovados para publicação serão devolvidos ao autor.
4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
6. Informações devem ser dirigidas a:

Universidade Estadual de Londrina

ou Universidade Estadual de Londrina

<p>Centro de Ciências Agrárias</p> <p>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva</p> <p>Comitê Editorial da Semina Ciências Agrárias</p> <p>Campus Universitário - Caixa Postal 600186051-990</p> <p>Londrina, Paraná, Brasil.</p> <p>Informações: Fone: 0xx43 33714709</p> <p>Fax: 0xx43 33714714</p> <p>Emails: vidotto@uel.br; csvjneve@uel.br</p>	<p>Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação</p> <p>Conselho Editorial das revistas Semina</p> <p>Campus Universitário - Caixa Postal 600186051-990</p> <p>Londrina, Paraná, Brasil.</p> <p>Informações: Fone: 0xx43 33714105</p> <p>Fax: Fone 0xx43 3328 4320</p> <p>Emails: eglema@uel.br;</p>
---	---

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no processo de submissão.**

Utilize o botão "**incluir autor**"

3. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte. A **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).

4. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)
5. O texto está em espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL);

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

6. URLs para as referências foram informadas quando necessário.

7. **Taxa de Submissão de novos artigos**

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor.

Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos a nova apreciação.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO 5



**ISSN 0102-0935 versão
impressa**

ISSN 1678-4162 versão online

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientação para tramitação de artigos](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e

em pdf no campo apropriado.

- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o

caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura: Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências;

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

strong>Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):
ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit->

[RelatedArticles/](#)>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência ou "Aguardando diligência do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

ANEXO 6

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Dobereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva pode usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMUM em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser comido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "insert" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos conjuntamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplando: (Christian & Tryphonas 1971, Pnester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como objetos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO 7

ANEXO

Questionário epidemiológico a ser aplicado nas propriedades amostradas

01-Identificação	Data da visita e colheita
Código da propriedade (3 dígitos): __ __ __	____/____/____
Proprietário:	Coordenadas geográficas:
_____	-
_____	Lat _____° _____', _____'
Propriedade:	_____
_____	-
_____	Lon _____° _____', _____'
_____	_____

02- Tipo de criação: <input type="checkbox"/> intensiva <input type="checkbox"/> semi-intensiva <input type="checkbox"/> extensiva
03- Tipo de exploração: <input type="checkbox"/> cria <input type="checkbox"/> recria/engorda <input type="checkbox"/> reprodução <input type="checkbox"/> subsistência
04- Finalidade: <input type="checkbox"/> corte <input type="checkbox"/> leite <input type="checkbox"/> mista
05- Produção de leite: (a) N ^o de cabras em lactação _____ (b) Produção diária de leite _____ litros
06- Caprinocultura é a principal atividade da propriedade? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim

07 – Caprinos existentes			
Machos		Fêmeas	
até 1 ano	> 1 ano	até 1 ano	> 1 ano

08- Outras espécies na propriedade: <input type="checkbox"/> bovinos <input type="checkbox"/> eqüídeos <input type="checkbox"/> suínos <input type="checkbox"/> aves <input type="checkbox"/> cão <input type="checkbox"/> gato
09- Espécies silvestres em vida livre na propriedade (raposa, teju, etc.): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
10- Plantas tóxicas na propriedade? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
11- Há assistência veterinária na propriedade? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
12- O funcionário recebeu algum treinamento? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
13- Há quanto tempo cria caprinos? <input type="checkbox"/> menos de 1 ano <input type="checkbox"/> de 1 a 3 anos <input type="checkbox"/> de 3 a 5 anos <input type="checkbox"/> mais de 5 anos
14- Qual raça predomina no rebanho? <input type="checkbox"/> pura <input type="checkbox"/> mista
15- Compra animais? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Onde/de quem: <input type="checkbox"/> em exposição <input type="checkbox"/> em leilão/feira <input type="checkbox"/> de comerciantes <input type="checkbox"/> de outras propriedades
16- Vende animais? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim A quem/onde: <input type="checkbox"/> em exposição <input type="checkbox"/> em leilão/feira <input type="checkbox"/> a comerciantes <input type="checkbox"/> a outras propriedades
17- Alimentação: pastagem nativa? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
18- Acesso a água: bebedouros? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim / aguadas? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim / rios, lagos, riachos, mananciais? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim

19- Infraestrutura	
a) centro de manejo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	e) energia elétrica: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
b) pedilúvio: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	f) água encanada: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
c) cocho de sal mineral: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	g) sala para ração: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
d) cerca de boa qualidade: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	h) tipo de aprisco: <input type="checkbox"/> chão batido <input type="checkbox"/> ripado <input type="checkbox"/> cimentado <input type="checkbox"/> outro

<p>20- Manejo reprodutivo</p> <p>a) monta natural: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim b) monta controlada: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim c) inseminação artificial: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim d) uso comum de reprodutor/sêmen entre propriedades: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>	<p>21- Pastagem</p> <p>a) pasto com áreas alagadiças: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim b) aluguel de pastos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim c) uso de pastos compartilhados: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim d) acesso rodoviário: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim e) presença de roedores: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>
---	---

<p>22- Manejo sanitário</p> <p>a) vermifugação: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim b) exames de OPG: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim c) corte e desinfecção de umbigo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim d) quarentena: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim e) desratização: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim f) anti-ratização: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim g) separa animais jovens de adultos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>	<p>h) enterra ou crema animais mortos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim i) higiene e assepsia das instalações: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim j) isolamento de animais doentes: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim k) piquete de parição: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim l) usa seringa e agulhas descartáveis: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim m) realiza algum exame quando compra animais: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim n) usa vacinas: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>
---	--

<p>23- Sinais clínicos no rebanho</p> <p>a) abortamento: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim b) corrimento vaginal: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim c) infertilidade: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim d) nascimento prematuro: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim e) natimortos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim f) nascimento de animais fracos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim g) morte ao desmame: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim h) anomalias congênitas: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim i) orquite/epididimite/balanopostite: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>	<p>j) problemas articulares: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim k) urina escura (hematúria): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim l) diarréia: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim m) tosse: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim n) corrimentos oculares e nasais: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim o) depressão, fraqueza: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim p) mamite: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim q) leite com alteração de cor: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim r) conjuntivite: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>
--	--

24- Animais amostrados			
Identificação*	Brinco	Está prenhe?	
		Sim	Não

* 5 dígitos (cód. da propriedade + número sequencial)