



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**DEPARTAMENTO DAS CLÍNICAS VETERINÁRIAS**

**THAIS BASTOS ROCHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) ATRAVÉS  
DA BACTERIOSCOPIA EM BÚFALOS ABATIDOS EM MATADOUROS DA  
BAIXADA MARANHENSE**

São Luís – MA

2016



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**DEPARTAMENTO DAS CLÍNICAS VETERINÁRIAS**

**THAIS BASTOS ROCHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) ATRAVÉS  
DA BACTERIOSCOPIA EM BÚFALOS ABATIDOS EM MATADOUROS DA  
BAIXADA MARANHENSE**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

**Orientador:** Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira

**Co - Orientador:** Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

**Co - Orientador:** Msc. Emerson Antonio Araújo de Oliveira

São Luís – MA

2016

Rocha, Thais Bastos.

Diagnóstico de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (MAP) através da bacterioscopia em búfalos abatidos em matadouros da Baixada Maranhense / Thais Bastos Rocha. – São Luís, 2016.

57p.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira.

1.*Bubalinos*. 2.*Ziehl-Neelsen*. 3.*Paratuberculose*. 4. *Maranhão* I.Título

CDU: 636.293.2:616.9(812.1)



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

THAIS BASTOS ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) ATRAVÉS  
DA BACTERIOSCOPIA EM BÚFALOS ABATIDOS EM MATADOUROS DA  
BAIXADA MARANHENSE**

Aprovada em: / /

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. PhD. Helder de Moraes Pereira (Orientador)**

Pós Doutor em Ciência Animal

Universidade Estadual do Maranhão

---

**Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos (1º membro)**

Doutor em Ciência Animal

Universidade Estadual do Maranhão

---

**Emerson Antônio Araújo de Oliveira (2º membro)**

Mestre em Ciência Animal

Universidade Estadual do Maranhão

*Dedico esse trabalho aos meus pais, que me incentivaram em toda minha trajetória, por compreenderem meus desejos e respeitá-los e por serem os melhores pais que Deus poderia me presentear.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por me conceder saúde, coragem e força para ir atrás dos meus objetivos. Obrigada Senhor meu Deus, por me dar a oportunidade de ter como profissão o que eu mais gosto de fazer.

À minha mãe, Maria de Fátima Bastos Rocha, meu Pai, José de Ribamar Muniz Rocha e ao meu irmão Thiago Bastos Rocha, que são fundamentais em minha vida, obrigada pela paciência comigo todos esses anos, pelo incentivo e amor que sempre dedicaram a mim e por terem acreditado e me proporcionado a chance de realizar meus sonhos.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram, que mesmo distante sempre me presenteavam com palavras de incentivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Helder de Mores Pereira, por ter me acolhido e ter sido fundamental para a minha formação acadêmica, além de um grande amigo, obrigada por todos os seus conselhos e orientações que vou levar por toda a vida. Ao Professor Dr. Hamilton Pereira Santos, também por me acolher e sempre estar disposto a nos ajudar e ensinar o que sabe, e ao mais novo Mestre, Emerson Antônio Araújo de Oliveira, pela paciência e por tudo que me ensinou, muito obrigada por confiarem e acreditarem na minha capacidade.

Aos amigos do Grupo de estudo e pesquisa com ruminantes domésticos – GEPRD, por me ajudarem, tanto nas coletas quanto nos longos dias no laboratório, por tornarem os nossos dias de trabalho cheios de alegria.

Aos meus amigos que me acompanharam durante toda a graduação, em especial: Carol Torres, David Teixeira, Izabelly Oliveira, Julie Emanuele, Thais Lara, Taynan Dulce, Pablo Santos, Rayule, Gabriel Xavier e Jéssica Lobo.

A Universidade Estadual do Maranhão pela estrutura e pelas oportunidades que tem me proporcionado para minha formação acadêmica.

Obrigada a todos, que por algum motivo não citei o nome, mas que sempre torceram por mim.

“Mas, sejam fortes e não desanimem, pois o trabalho de vocês será recompensado”.

(Crônicas 15:7)

## RESUMO

A paratuberculose é considerada uma enterite crônica granulomatosa, incurável, causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que afeta principalmente os ruminantes, podendo atingir também outras espécies de animais. É responsável por perdas econômicas que ocorrem pela redução na produtividade e maior susceptibilidade a outras doenças, causando um considerável impacto na economia. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi diagnosticar o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) nos rebanhos bubalinos abatidos na região da Baixada Maranhense. Foram coletadas amostras de intestino delgado, intestino grosso, linfonodos mesentéricos e fezes de 115 búfalos abatidos em matadouros da Baixada Maranhense. Para o diagnóstico dessa enfermidade, foram realizados exames histopatológicos utilizando as colorações de Hematoxilina e Eosina (H&E), Ziehl-Neelsen (ZN) e isolamento bacteriano. Foi possível evidenciar infiltrado inflamatório granulomatoso composto por macrófagos epitelióides repleto de células gigantes tipo Langhans na mucosa, infiltrado mononuclear na submucosa, com atrofia e fusão das vilosidades no intestino delgado, e infiltrado difuso acentuado de macrófagos epitelióides e células gigantes tipo Langhans nos linfonodos mesentéricos, quando submetidas ao diagnóstico histopatológico, em 27% (31/115) dos búfalos. Com a coloração de Ziehl-Neelsen foram visualizados bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) em 23% (26/115) das amostras dos tecidos analisados. Nas amostras de fezes submetidas ao cultivo bacteriano foi identificado o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em 19% (5/26). Os resultados desse estudo demonstram a ocorrência subclínica de paratuberculose em rebanhos bubalinos abatidos em matadouros da Baixada Maranhense.

**Palavras-chave:** Bubalinos, Ziehl-Neelsen, paratuberculose, Maranhão.

## ABSTRAT

The Paratuberculosis is a granulomatous chronic enteritis wich is incurable and it is caused by the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) which mainly affects the ruminant animals and might be pathogenic to another species of animals. It is considered responsible for economic losses that occur by decreased productivity and increased susceptibility to others infections, causing a negative impact on the economy. In this way, the aim of the present study is to diagnose the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in herds of slaughtered buffaloes of lowlands region in the state of Maranhao . It was collected tissue samples of small and large intestine, mesenteric lymphs and stool samples from 115 slaughtered buffalos from slaughterhouses of the Maranhao lowlands. For diagnosing that disease, histological examination with hematoxylin and eosin's colouring (H&E), Ziehl-Neelsen and bacterial examination were made. It was possible to show granulomatous inflammatory infiltrate composed of epithelioid macrophages filled with Langhans giant cells in the mucosal mononuclear infiltrate in the submucosa, with atrophy and fusion of the villi in the small intestine, and severe diffuse infiltrate of epithelioid macrophages and Langhans giant cells in mesenteric lymph nodes, when subjected to histopathological diagnosis in 27% (31/115) of buffalo. With the Ziehl-Neelsen bacilli were visualized acid-alcohol resistant (AFB) in 23% (26/115) of samples from tissues analyzed. The stool samples were submitted to bacterial cultivation and it was viewed the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at 19% (5/26). The results of this study show the subclinical occurring of Paratuberculosis in herds of slaughtered buffaloes in slaughterhouses of lowlands region in the state of Maranhao.

**Key words:** Buffaloes, Ziehl-Neelsen, paratuberculosis, Maranhao.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa ilustrando os municípios da Baixada maranhense..... 33
- Figura 2.** Coleta dos tecidos de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso (A); Armazenamento e fixação em formol a 10% dos fragmentos de tecidos de búfalos abatidos em matadouro de Viana- Ma e Arari- Ma (B)..... 34
- Figura 3.** Fotomicrografia do intestino delgado de búfalo, evidenciando aglomerado de células gigantes na mucosa ( Círculos ) . Hematoxilina e eosina. 20x..... 37
- Figura 4.** (A) Fotomicrografia do intestino delgado (jejuno) de búfalo, evidenciando lesão granulomatosa com intenso infiltrado (setas) de células, macrófagos epitelióide e células gigantes na mucosa. Hematoxilina e eosina. 40x (B) Infiltrado inflamatório (INF) granulomatoso, neutrófilos, eosinófilos, células gigantes. Hematoxilina e eosina. 100x.....38
- Figura 5.** Fotomicrografia do intestino delgado (jejuno) de búfalo, evidenciando infiltrado (INF) inflamatório de macrófagos epitelioides e células gigantes, com atrofia e fusão das vilosidades (seta). Hematoxilina e eosina. 20x..... 39
- Figura 6.** Fotomicrografia de linfonodo mesentérico de búfalo, evidenciando o infiltrado (INF) difuso acentuado de macrófagos epitelióides e células gigantes tipo Langhans ( setas ). Hematoxilina e eosina. 20x.....39
- Figura 7.** Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado ( íleo) de búfalo, com numerosos bacilos álcool-ácido resistentes (seta). Ziehl—Neelsen. 40x..... 41
- Figura 8.** Fotografia de um cultivo para isolamento do MAP, onde se observa Colônias bacterianas típicas de *Mycobacterium Avium subsp. paratuberculosis* em meio Herrold com micobactina, de amostras fecais de búfalos..... 43
- Figura 9.** Visualização de Bacilos álcool ácido-resistentes isoladas em meio Herrold com micobactina, de amostras fecais de búfalos. 40x.....43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação das amostras submetidas a análise bacterioscópica, quanto ao diagnóstico da paratuberculose em búfalos abatidos nos matadouros de Viana- MA e Arari-MA, 20016. (OLIVEIRA, 2015 modificado).....	45
---	----

## LISTA DE ABREVEATURAS

**MAP-** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;

**BAAR-** Bacilo álcool-ácido resistente;

**HEYM-** Herrold's egg-yolk médium;

**HE-** Hematoxilina e eosina;

**ZN-** Ziehl-Neelsen;

**SUBSP-** Subespécie;

**AGED-** Agência Estadual de Defesa Agropecuária;

**OIE-** Organização Mundial da Saúde Animal;

**GEPRD-** Grupo de Estudo e Pesquisa com Ruminantes domésticos;

**LDI** – Laboratório Diagnóstico de Doenças Infecciosas.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 BAIXADA MARANHENSE .....	18
3.2 BUBALINOCULTURA .....	18
3.3 BÚFALO NO MARANHÃO .....	18
3.4 PARATUBERCULOSE .....	19
3.4.1 HISTÓRICO DE DA DOENÇA .....	20
3.4.2 PARATUBERCULOSE NO BRASIL.....	22
3.4.3 ETIOLOGIA E AGENTE ETIOLÓGICO .....	24
3.4.4 EPIDEMIOLOGIA .....	25
3.4.5 PATOGENIA .....	27
3.4.6 SINAIS CLÍNICOS .....	28
3.4.7 DIAGNÓSTICO .....	28
3.4.8 ACHADOS DE NECROPSIA .....	29
3.5 TESTES SOROLÓGICOS .....	29
3.6 CULTIVO BACTERIANO .....	30
3.7 HISTOPATOLOGIA .....	30
3.8 TRATAMENTO .....	30
3.9 CONTROLE E PROFILAXIA .....	31
3.10 SAÚDE PÚBLICA .....	31
<b>4. MATERIAIS E METÓDOS</b> .....	32
4.1 ÁREA DE ESTUDO .....	32
4.2 AMOSTRAGEM .....	34
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS .....	34
4.4 HISTOLOGIA .....	35
4.4.1 PROCESSAMENTOS DOS TECIDOS PARA HISTOPATOLOGIA .....	35
4.4.2 TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E HEOSINA (HE).....	35
4.4.3 TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHNL – NEELSEN (ZN).....	35
4.4.4 ISOLAMENTO BACTERIANO .....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCURSÕES</b> .....	36
5.1 HISTOPATOLOGIA .....	37
5.2 BACTERIOSCOPIA .....	41
5.3 ISOLAMENTO BACTERIANO .....	42
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	







## 1. INTRODUÇÃO

Os bubalinos foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, em pequenos lotes originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe, motivados muito mais pelo seu exotismo que por suas qualidades zootécnicas. A sua adaptação aos mais variados ambientes, elevada fertilidade e longevidade produtiva, permitiram que o rebanho experimentasse uma evolução significativa e, dos pouco mais de 200 animais introduzidos no país, resultaram num rebanho de 495 mil búfalos em 1980. A exploração de búfalos no país destinava - se fundamentalmente à produção de carne, no entanto a partir dos anos 80/90, verificou-se um interesse crescente em sua exploração leiteira ou mista (BERNARDES, 2007).

O Maranhão apresenta um lugar de destaque no panorama nacional da bubalinocultura, concentrando o 5º maior rebanho do Brasil e o 1º na região Nordeste, com cerca de 80. 212 mil bubalinos, dos quais estão concentrados em sua grande maioria nos municípios da Baixada Maranhense, em destaque, o município de Viana – MA com 18. 078 cabeças, segundo dados do IBGE, 2014.

Na Baixada Maranhense, a criação de búfalos em sua maioria é extensiva, sem nenhuma técnica de manejo adequada. O contato com esse rebanho se torna difícil em determinadas épocas do ano, tanto pela localização da região quanto pelos hábitos desses animais, que tendem a permanecer agrupados em poços d'água, facilitando por sua vez a disseminação de doenças, dentre estas enfermidades destaca-se a paratuberculose.

A paratuberculose (doença de Johne) é uma enfermidade infecciosa crônica, incurável, é caracterizada por uma enterite granulomatosa crônica causada por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool-ácido resistente (CLARKE 1997; MORAVKOVA et al., 2008), ocorre em todos os continentes, e é responsável por importantes perdas econômicas em ruminantes no Brasil (RIET-CORREA & DRIEMEIER, 2007; MORAVKOVA et al., 2008.).

No Brasil, há relatos da paratuberculose em bovinos em diversos Estados das regiões Sul e Sudeste (PORTUGAL et al., 1979; RAMOS et al., 1986; DRIEMEIER et al., 1999; GOMES et al., 2002). Recentemente a doença foi diagnosticada, também, em bubalinos (MOTA et al., 2010) na região nordeste do Brasil. Na Paraíba a paratuberculose foi diagnosticada em bovinos (MOTA et al., 2009) e em ovinos e caprinos (OLIVEIRA et al.,

2010), afetando principalmente ruminantes domésticos e, com menor frequência, ruminantes selvagens, equinos, suínos, lebres, raposas e roedores (OIE, 2012).

Na espécie bubalina, apesar de ser considerado menos susceptível à infecção pelo MAP em relação aos bovinos (SIVAKUMAR et al., 2006), foram relatados, até o momento, casos clínicos de paratuberculose em duas regiões do país, o primeiro caso foi descrito na região Nordeste, estado de Pernambuco por Mota et al. (2010), em seguida por Barbosa et al. (2010) no estado de Maranhão.

A infecção se dá pela ingestão de colostro, leite ou água contaminados com fezes que contêm o microrganismo. A doença clínica se manifesta apenas na vida adulta, geralmente após três anos de infecção subclínica. Os animais clinicamente acometidos apresentam diarreia profusa, perda de peso, desidratação, caquexia e morte e as lesões localizam-se principalmente no trato intestinal e linfonodos mesentéricos, causando consideráveis perdas econômicas verificadas em função da infecção subclínica, em que à redução da conversão alimentar, diminuição da produtividade, redução dos níveis de proteína e gordura no leite, perda de peso ao abate, alta incidência de mastite e diminuição da fertilidade (CLARKE, 1997).

O acentuado acúmulo de células inflamatórias, principalmente na mucosa e submucosa intestinal, desencadeia a chamada síndrome da má absorção, o que diminui a assimilação de nutrientes, reduz a eficiência produtiva e causa o declínio da condição corporal (CHIODINI et. al., 1984; CLARKE, 1997). Normalmente, a manifestação clínica da paratuberculose está associada com eventos de estresse como partos, deficiência nutricional e produção de leite elevada (CLARKE, 1997).

O diagnóstico dessa infecção é feito através dos sinais clínicos e para a confirmação do diagnóstico é necessária a realização de necropsia e de exames laboratoriais. Os testes diagnósticos preferencialmente utilizados para diagnosticar a paratuberculose, podem ser divididos em duas principais categorias: métodos para a detecção do agente e métodos de detecção de anticorpos específicos presentes no soro. Os testes para detecção do agente incluem cultura bacteriana, sondas genéticas e exame histológico de tecidos-alvo para detecção do bacilo álcool-ácido resistente (BUERGELT e GINN, 2000).

Considerando a importância que a enfermidade possui dentro dos rebanhos, bem como seu caráter zoonótico, juntamente aos poucos dados epidemiológicos no rebanho

bubalino do Maranhão, aliado a práticas deficientes e/ou inexistentes de sanidade nas propriedades e a ausência de fiscalização nos abatedouros municipais, principalmente na Baixada Maranhense é que se propôs a pesquisa.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- Identificar o *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) em búfalos abatidos em matadouros da baixada maranhense;

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar as alterações histopatológicas em tecidos corados em Hematoxilina e Eosina;
- Identificação de bacilos Álcool Ácidos - Resistente em amostras de tecidos submetidos a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen;
- Isolar o *Mycobacterium avium subs. paratuberculosis* (MAP) de conteúdo fecal no cultivo bacteriológico;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Baixada Maranhense

A Baixada Maranhense é uma das microrregiões do Estado brasileiro do Maranhão pertencente à mesorregião Norte Maranhense. Possui uma área total de 17.579,366 km<sup>2</sup>, dividida em 21 municípios, estende-se por 20 mil km<sup>2</sup> nos baixos cursos dos rios Mearim e Pindaré, e médios e baixos cursos dos rios Rericumã e Aurá, abrangendo um dos mais belos conjuntos de lagos e lagoas naturais do Brasil.

Constitui uma ampla região marcada pela diversidade de ricos ecossistemas, tais como rios, lagos estuários e áreas alagáveis. Sua vegetação é rica e variada com a existência desde manguezais, campos aluviais flúvio marinhos, abertos, perto dos lagos, até densas florestas de galeria ao longo dos rios, com babaçuais formando “ilhas” nas terras mais altas, pouco atingidas pelas enchentes. Está presente na região, uma rica fauna e flora aquática e terrestre, com diversas espécies raras. A região fica seis meses seca e seis meses alagada. Na estação chuvosa, quando os rios e lagos transbordam, os campos são inundados e transformados em extensos lagos rasos. Parte das águas é devolvida aos rios quando seus níveis baixam (MUNIZ, 2007).

#### 3.2 Bubalinocultura

O búfalo doméstico, espécie *Bubalus bubalis*, teve sua origem no continente asiático, onde foi levado à África, posteriormente à Europa e Oceania e finalmente à América (DAMÉ, 2006). Somente no final do século XIX pequenos lotes de búfalos originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe foram introduzidos no Brasil, mais precisamente na ilha de Marajó, no Estado do Pará, búfalos da raça carabão (ZAVA, 1987, citado por GONÇALVES, 2008), escolhidos inicialmente mais pelo seu exotismo que por suas características produtivas (BERNARDES, 2007). Em 1895 foi realizada outra importação de búfalos italianos, e em 1952, outra leva de búfalos vieram para o Brasil, vindos da Itália e da Índia (PIMENTEL et al. 2010), fortalecendo ainda mais a criação no país.

O maior conhecimento de suas potencialidades e características produtivas associada a diversas ações promocionais, motivou acentuada expansão e disseminação da espécie para diversas regiões, inicialmente com o objetivo de ocupar os chamados “vazios

pecuários”, regiões em que, por suas características naturais, a pecuária bovina não se desenvolvia bem e, posteriormente, com o avanço de explorações com características mais profissionais observou-se sua introdução mesmo em regiões de maior tradição pecuária bovina, onde passaram a ser explorados tanto para corte quanto para produção leiteira (BERNARDES, 2007).

Zootecnicamente a espécie já demonstrou que tem espaço garantido como opção pecuária relevante. No que se refere a seus produtos (carne, leite e derivados), não resta dúvidas sobre sua excelente qualidade, propriedades sensoriais, nutricionais e mesmo funcionais. Por sua grande adaptabilidade, mostra-se como opção econômica aos mais diversos ambientes (BERNARDES, 2007).

No Brasil, a exploração de búfalos destina-se principalmente à produção de carne, pois ainda falta tradição dos criadores brasileiros em explorar a produção leiteira (ROSA et al. (2007), citado por ALMEIDA et al., 2013), a exploração para corte é normalmente feita sob sistemas extensivos, tendo como base alimentar as pastagens, porém sem suplementação adequada, o que leva ao não suprimento das exigências nutricionais do animal, fazendo com que esse não desempenhe sua capacidade produtiva (BERNARDES, 2007).

### **3.3 Búfalos no Maranhão**

Segundo o IBGE, 2013, o efetivo brasileiro de bubalinos é de 1,332 milhão de cabeças. Onde a maior concentração desse plantel ocorre na Região Norte, onde 66,1% do efetivo encontra - se mais especificamente em dois estados, Pará e Amapá, que, em conjunto, detém 58,3% do efetivo nacional dessa espécie. Na sequência, o Estado do Amazonas, com 6,4% de participação. A Região Sudeste com 11,3% do efetivo, localizado nos Estados de São Paulo (6,2%) e Minas Gerais (4,3%). Na Região Nordeste, foi registrado 9,5% do efetivo nacional, bastante concentrado no Estado do Maranhão (6,1%).

Observou-se que para a introdução da bubalinocultura na Baixada Maranhense, no final dos anos 1950 e início dos anos 1960, não houve um planejamento estruturado que permitisse prever os impactos sociais e ambientais que o animal exótico causaria em um ambiente ecologicamente instável (BERNARDI, 2005).

Oficialmente o Búfalo veio para o Maranhão sob imposição dos diretores do Ministério da Agricultura que conheciam e consideravam baixos os índices técnicos do gado da Baixada. A maior quantidade de búfalos vindos para o Maranhão ocorreu através de um convênio firmado entre o Ministério da Agricultura, na pessoa do Médico Veterinário, Dr. Raimundo Cardoso Nogueira, na época diretor geral do departamento Nacional de produção animal do Ministério da Agricultura, no período de 1969 a 1974, e a secretaria da Agricultura do estado do Maranhão, sob a direção do Engenheiro Agrônomo Lourenço Vieira da Silva, através desse convênio, o Estado do Maranhão teria a sua disposição 700 cabeças de búfalos oriundas da Fazenda Maicurus, localizada em Monte Alegre, Baixo Amazonas – Pará, dos quais foram para a Fazenda Bubalina no município de Pinheiro- MA (VASCONCELOS, 2012).

O alagamento dos campos, dentre outros fatores, tornou a Baixada Maranhense o ambiente ideal para criação bubalina; estes foram trazidos principalmente da ilha de Marajó para o Maranhão sob a justificativa de que a expansão do setor de criação de bubalino como contribuiria com a riqueza e o desenvolvimento econômico da região (BERNARDI, 2005).

### **3.4 Paratuberculose**

#### **3.4.1 Histórico da doença**

A primeira descrição da paratuberculose foi feita por Johne e Frothingam, na Alemanha em 1895. Os autores de forma equivocada, atribuíram o quadro de perda de peso e diarreia crônica, em uma vaca de seis anos de idade a uma forma atípica de tuberculose (JOHNE & FROTHIGAM, 1895) .

No início foi proposto o nome de enterite pseudotuberculosa, e posteriormente foi modificado para paratuberculose, ao constatarem que se tratava de uma bactéria diferente daquela causadora da tuberculose. Anos mais tarde foi denominada de doença de Johne. Apenas em 1910, o microrganismo foi isolado em meio de cultivo e caracterizado como *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne* (TWORT & INGRAM ,1912). Após pesquisas, estudiosos o denominaram de *Mycobacterium johnei* e *Mycobacterium paratuberculosis*, apenas em 1990 recebeu a denominação taxonômica de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (THOREL et al. (1990), citado por SCHARZ, 2012).

A Paratuberculose foi descrita em países da América do Sul e Índia, na década de 30, demonstrando, que a doença estava mundialmente distribuída e que era uma possível

ameaça à atividade pecuária. Nos anos 40, já era conhecida como uma doença de animais domésticos e silvestres. Com a avaliação dos testes diagnósticos até então utilizados, foram observadas reações cruzadas, que resultaram em reações falso-positivas com organismos do gênero *Corynebacterium* e outras espécies antigenicamente relacionadas. Algumas medidas de controle foram avaliadas e, em 1950, surgiram diversos experimentos em vacinação. Nos anos 60, vários outros testes diagnósticos foram criados como, por exemplo, a migração de leucócitos e teste de imunofluorescência. Ainda nesse período, ficou reconhecida a participação de animais subclínicamente infectados que eliminavam o agente por meio das fezes e a possibilidade de se encontrar o *M. paratuberculosis* em sêmem de touros e úteros de vacas infectados, indicando uma provável infecção intra e trans-uterina do feto. Nas décadas de 70 e 80, vários pesquisadores começaram a estudar mais intensamente o *Mycobacterium paratuberculosis* e a doença de Johne, proporcionando avanços nos conhecimentos sobre a Paratuberculose. Em 1983, MERKAL organizou o primeiro Colóquio Internacional em Paratuberculose (CHIODINI (1993); citado por COLLINS e MANNIN, 2003).

No final dos anos 80 e início dos anos 90, novos achados em relação a paratuberculose aconteceram, com a descoberta, por COLLINS e McFADEAN, de uma sequência genética, única do *Mycobacterium paratuberculosis*. Essa sequência de nucleotídeos foi denominada de IS900, sendo a primeira sequência de inserção já registrada em micobactérias. A importância desta descoberta foi a de utilizar métodos genéticos para detectar MAP, já que a detecção mediante cultivo em meios de cultura leva em torno de 16 semanas. Além disso, tal descoberta alicerça a sugestão de muitos pesquisadores sobre a participação do MAP como agente etiológico da doença de Crohn, após este ter sido isolado de amostras de intestino e nódulos linfáticos de paciente com esta enfermidade (CHIODINI, 1993).

### **3.4.2 Paratuberculose no Brasil**

A Paratuberculose foi diagnosticada no Brasil pela primeira vez, em bovinos importados, da raça Flamengo no então Posto Zootécnico Federal de Pinheiros, no Rio de Janeiro, por OCTÁVIO DUPPONT, que fez a divulgação do fato pelo Jornal do Comércio do estado do Rio de Janeiro, em 5 de janeiro de 1915 (DACORSO FILHO et al., 1960).

Em 1956, Santos e Silva relataram a doença, em um touro de seis anos de idade, da raça Holandesa, importado da Holanda com um ano e meio de idade, para uma fazenda no município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro.

Darcorso Filho et al., (1960), diagnosticaram a doença através de exames clinicopatológicos em dois bovinos nascidos e criados no Estado do Rio de Janeiro, um no município de Petrópolis e outro no bairro de Bangu, município do Rio de Janeiro.

No ano 1961, Silva e Pizelli realizaram o diagnóstico de paratuberculose em bovinos da raça Jersey, oriundos de uma propriedade situada no Município de Petrópolis-RJ. Na mesma época foi isolado, pela primeira vez no Brasil, o *Mycobacterium paratuberculosis*, a partir de suspensões de gânglios linfáticos mesentéricos de bovino (SILVA, 1961). O isolamento foi feito em meio de cultura Hohn, e paralelamente isolou também a micobactéria em ovos de galinha embrionados, a partir da suspensão do mesmo material relatado por Silva, (1961) e constatou a susceptibilidade da espécie à infecção.

Em 1968, novamente Silva reproduziu a paratuberculose em ovinos através de inoculação, por via oral, de emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal provenientes de um bovino com a doença de Johne.

Portugal et al., (1979) relataram dois casos de paratuberculose bovina no estado de Santa Catarina: um em touro nacional da raça Normanda, e em uma fêmea Holandesa importada da Holanda, o primeiro com cinco anos e a fêmea holandesa com seis anos de idade, respectivamente.

Outro caso clínico da enfermidade foi descrito no Rio Grande do Sul, o diagnóstico foi comprovado em um touro da raça holandesa, doador de sêmem em central de inseminação artificial, pelo isolamento do agente (RAMOS et al., 1986).

No ano de 1991, em Minas Gerais, registraram a enfermidade em uma vaca com cinco anos de idade da raça Holandesa que fora importada dos Estados Unidos da América (NAKAJIMA et al., 1991).

Poester e Ramos, (1994), no Rio Grande do Sul, reproduziram a doença de Johne em caprinos inoculados, por via oral, com emulsão de mucosa intestinal de bovino com paratuberculose.

Driemeier et al., (1999), no Rio Grande do Sul, descreveram as lesões clínico-patológicas observadas em oito vacas com doença de Johne, provenientes de um rebanho de 345 animais, sendo que a maioria desses animais eram vacas importadas da Argentina.

Fonseca et al., (2000) relataram que 37,9% das vacas foram soropositivas no teste ELISA em 20 rebanhos no Estado de São Paulo.

No Rio de Janeiro, Ferreira; Fonseca; Lilenbaum, (2001) detectaram através do teste ELISA, anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em 45 propriedades localizadas em diversos municípios do Estado do Rio de Janeiro.

Gomes et al., (2002) isolaram e identificaram MAP em amostras provenientes de oito vacas holandesas, importadas da Argentina, no município de Capela de Santana, Estado do Rio Grande do Sul. No mesmo ano, Dias et al., (2002) isolaram o MAP a partir de fezes de bovinos procedentes de um rebanho da Paraíba. O isolamento foi feito na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Cunha et al., (2003) descreveram um caso da enfermidade, em bovino macho de cerca de quatro anos, da raça Blond D'Aquitane, no Estado de Goiás. Neste mesmo ano, FERREIRA et al., (2003) relataram a ocorrência de paratuberculose em rebanho bovino, no município de Resende, Estado do Rio de Janeiro.

Silva, (2005) relatou a paratuberculose em bovinos de corte em diversos municípios do Estado do Pará. Ainda em 2005, Acypreste et al. detectaram em Goiânia, 60,24% de animais soro-reagentes em 166 amostras ao teste ELISA. Foram avaliadas 23 propriedades leiteiras e todas apresentaram animais positivos.

Ristow et al., (2006), no Rio de Janeiro, relataram a doença através da sorologia, cultivo microbiano e exames anatomo-histopatológicos, em rebanho bovino. Em 2007, Mota et al. diagnosticaram a enfermidade em rebanhos leiteiros na região de Zona da Mata em Pernambuco, através do isolamento do agente, sorologia e exames anatomohistopatológicos.

Oliveira et al., (2008) descreveram dois casos de paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba. O primeiro era uma fêmea mestiça de três anos, do município de São José de Pinharas, oriundo recentemente do Estado do Pernambuco, e o segundo, um macho holandês de três anos oriundo do município de Passagem.

Mota et al.,( 2009) relataram a ocorrência de paratuberculose em rebanho bovino leiteiro da raça Gyr na Paraíba.

Em 2010, Mota et al., observaram a ocorrência de paratuberculose em cinco bubalinos criados em regime semi-intensivo em fazendas no estado de Pernambuco. No mesmo ano, foram relatados, casos clínicos de paratuberculose bubalina em duas regiões do país, o primeiro caso foi descrito na região nordeste, estado de Pernambuco por Mota et al., (2010). Posteriormente, Dalto et al., (2012) relataram um rebanho bubalino infectado por MAP na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul.

Em 2012, Medeiros et al. encontraram, através da determinação de anticorpos pelo ELISA para o MAP, a doença subclínica em caprinos e ovinos de 14 municípios do semiárido Paraibano, verificando uma frequência média de caprinos  $44,86 \pm 22,91\%$  e em ovinos de  $52,96 \pm 31,49$ , na Paraíba.

Em 2013, Yamasaki et al. descreveram os aspectos clínico-patológicos da paratuberculose em bovinos leiteiros situados em propriedades do município de Rio de Claro, região Sul do estado do Rio de Janeiro.

Barbosa et al., (2015), empregando a técnica de biópsia retal associada à histopatologia e Ziehl-Neelsen (ZN) para diagnóstico da paratuberculose em propriedades bubalinas no estado Maranhão, observaram uma frequência de 4,3% (6/140) dos búfalos apresentando bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no Ziehl-Neelsen, e 5,71% (7/140) tiveram amplificação do material genético na qPCR.

### 3.4.3 Etiologia e Agente etiológico

O *Mycobacterium avium (subsp.) paratuberculosis (MAP)*, é um patógeno intracelular facultativo, caracterizado como um bastonete pequeno de aproximadamente 0,5 x 1,5µm, gram positivo, imóvel, não esporulado, aeróbico e fortemente álcool-ácido-resistente. Além de possuir outras propriedades como a hidrofobicidade, a alta resistência a processos químicos como a cloração da água e a processos físicos como a pasteurização (CASTRO e TRABULSI, 1999; GRANT et al, 1999; WHAN et al, 2001).

A maioria das espécies do gênero *Mycobacterium spp* produz dois sideróforos: micobactina e exoquelina, porém, o MAP assim como o *M. avium subsp. silvaticum* e outras cepas de *M. avium* não produzem micobactina, incapacitando-o de sequestrar o ferro fora do hospedeiro, tornando-o dependente (GOMES, 2002; COCITO et al., 1994).

Este microrganismo é bastante fastidioso, seu isolamento e cultivo em meios de cultura é tarefa trabalhosa e demorada. Quando crescido em meios artificiais como "Herrold Egg Yolk MédiuM" (HEYM), "Reid-Watson" ou "Lowenstein Jensen" (LJ), formam colônias rugosas despigmentadas, de crescimento lento, em torno de 8 a 12 semanas. (TAYLOR, 1957; BARCLAY et al., (1985), citados por GOMES, 2002).

#### **3.4.4 Epidemiologia**

Os aspectos epidemiológicos da paratuberculose tem sido descritos mundialmente . A prevalência da doença vem aumentando em alguns países onde tem alcançado proporções significativas economicamente na pecuária (MENZIES (1998), citado por ROGRIGUES, 2005).

A doença acomete principalmente os bovinos, mas também já foi diagnosticada em búfalos (MOTA et al., 2010; DALTO, 2011), ovinos caprinos ( OLIVEIRA et al., 2010), ruminantes selvagens, equinos, suínos, lebre, raposas e roedores. A principal forma de introdução da doença em rebanhos livres está associada aos animais portadores do MAP na forma subclínica. A infecção está estritamente ligada com faixa etária, geralmente ocorrendo nos primeiros meses de vida, com predileção por animais jovens, porém a doença se manifesta com maior frequência, entre 2 e 5 anos de idade (OIE, 2012). A transmissão para animais adultos é pouco comum, pois são mais resistentes a infecção, porém alguns pesquisadores reproduziram a doença em indivíduos desta faixa etária através da administração de diferentes doses de MAP (KURADE et al., 2004; CLARKE et al., 2010; CLARKE et al., 2011).

Fatores intrínsecos restritos aos bezerros lactentes contribuem para a maior susceptibilidade dos animais jovens à infecção pelo MAP, como a maior acidez intestinal quando comparado aos adultos, fato que favorece a sobrevivência da micobactéria (RICHARDS, 1981). Assim como os fatores estressantes como parto e má nutrição podem desencadear o aparecimento dos sinais clínicos da doença (BUERGELT, 1996).

A principal via de infecção é oro - fecal nos primeiros meses de vida do animal, no momento da ingestão de colostro ou leite e quando entram em contato com o úbere contaminado com fezes contendo a micobactéria (BEGG E WHITTINGTON (2008), citado por YAMASAKI, 2013), além disso, não possuem seu sistema imunológico completamente desenvolvido, aumentando os riscos de infecção (MOMOTANI et al., 1988). Outras formas

de transmissão são, contágio interespécies o qual afirma a possibilidade de infecção de ovinos com bovinos, caprinos, cervídeos vice-versa, a infecção ocorre de forma vertical trans e intrauterina para o feto ou por sêmen de machos infectados (OIE, 2012).

Alguns fatores ambientais também podem contribuir para a disseminação da infecção, como por exemplo, o pH do solo pode influenciar na gravidade dos sinais clínicos, rebanhos criados em solos alcalinos podem apresentar alta incidência da infecção com poucos casos clínicos, ao contrário de locais com solos ácidos onde há registros de ocorrência de sinais clínicos acentuados. Este fato está aparentemente relacionado ao efeito do pH na assimilação do ferro pelo MAP; ou melhor, um ambiente ácido aumenta a captação do ferro pela micobactéria (JOHNSON-IFEARULUNDU et al., 1997). Outro fato que contribui para alto risco da infecção é a criação de bovinos em sistema de confinamento, devido ao fato da grande contaminação do ambiente com fezes de animais infectados, que favorece a manutenção do MAP dentro do rebanho. No pasto, o agente persiste por longos períodos e em condições favoráveis, e pode permanecer infectante por mais de um ano; a micobactéria é sensível à luz solar e ao ressecamento e sua sobrevivência é reduzida por contato constante com fezes e urina no ambiente (JOHNSON-IFEARULUNDU et al., 1997).

O desenvolvimento da doença é um processo lento e a subsequente imperceptível e prolongada transição entre os estágios da infecção, dificultam a detecção de todos os animais infectados no rebanho (BEHR & COLLINS, 2010). Os dados sobre a prevalência mundial da paratuberculose variam notavelmente de acordo com a metodologia utilizada no estudo e o tipo de amostra analisada (NIELSEN & TOFT, 2008, BEHR & COLLINS 2010, TIMMS et al., (2011); OIE 2012). Estima-se que cerca de 30 a 50% do rebanho mundial está infectado (BEHR & COLLINS, 2010). Em um rebanho bovino infectado, em média, 10% dos animais desenvolvem a doença, o restante, em sua maioria, eliminam o agente através das fezes, sem apresentar os sinais clínicos ao longo de sua vida (NIELSEN & TOFT, 2008).

Atualmente no Brasil, foram relatados vários casos de paratuberculose em bovinos nascidos e criados no país, com isso, pode-se afirmar que a importação de bovinos infectados não é mais considerado um aspecto epidemiológico importante (GOMES et al, 2002; MOTA et al., 2007).

### **3.4.5 Patogenia**

Após a ingestão, o MAP é fagocitado pelas células M, que têm a função de recobrir as placas de Peyer e transportar antígenos da barreira epitelial do lúmen intestinal para o tecido linfoide. As células M são a via de infecção para alguns patógenos e porta de entrada do antígeno para iniciar as respostas imunológicas de proteção (MOMOTANI et al., 1988; COUSSENS et al., 2010; FUKUDA et al., 2011). Uma vez dentro de macrófagos, o patógeno persiste e se multiplica no interior do fagossomo, à semelhança do *M. tuberculosis*, a capacidade de se manter no ambiente intracelular se deve à habilidade da micobactéria em bloquear a fusão do fagossomo com o lisossomo (GATFIELD & PIETERS (2003), ROHDE et al. (2007), citado por YAMASAKI, 2013.).

O transporte via células M é importante na fase inicial da infecção, pois permite que o MAP alcance os macrófagos abaixo da barreira mucosa; os macrófagos infectados podem migrar para os linfáticos intestinais e se espalham para os linfonodos mesentéricos. A localização das placas de Peyer, em maior proporção no íleo, pode explicar o porquê das lesões intestinais se iniciarem nesta região (MOMOTANI et al., 1988).

No interior dos macrófagos, MAP pode se manter intacto e, a partir daí, proliferar-se ou ser processado e apresentado aos linfócitos T. Nesta fase, a batalha entre o hospedeiro e o microrganismo causa uma interação complexa entre macrófagos e linfócitos, a qual promove a secreção de uma cascata de citocinas, o recrutamento de células para o local da infecção, a ativação e proliferação de células. Em infecções causadas por micobactérias, tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células estão envolvidas, sendo esta última a mais importante para proteção da imunidade (COUSINS et al., 1999; STABEL et al., 2000).

A presença de acentuada inflamação granulomatosa na mucosa intestinal desencadeia a chamada síndrome da má absorção, que diminui a assimilação de nutrientes e causa a exsudação na luz intestinal levando ao quadro de diarreia e emagrecimento (BUERGELT, et al., 1978; CHIODINI, et al., 1984; CLARKE, 1997).

Na doença de Johne, o desenvolvimento da resposta imune tem sido descrito somente em estudos experimentais. Nestes casos, a imunidade celular pode ser observada de um a dois meses após a infecção, enquanto a resposta humoral pode ser detectada de 10 a 17 meses após a infecção (LEPPER et al. (1989) citado por GOMES, 2002.)

### **3.4.6 Sinais Clínicos**

A sintomatologia típica da paratuberculose ocorre em animais a partir de dois anos de idade, época em que a doença progride para a fase terminal e resulta em morte do animal (CLARKE, 1997). Os sinais clínicos se caracterizam por perda progressiva de peso, desidratação, apetite normal, diarreia intermitente profusa, homogênea, semifluida ou líquida, esverdeada no início que se torna marrom escuro, não responsivos a tratamentos, que resultam em morte do animal, (SHERMAN, 1985).

Existe pouca correlação entre a severidade da síndrome clínica e a severidade das lesões. Muitos animais que chegam a morrer podem conter lesões macro- e microscópicas tão sutis que não podem ser notadas a menos que sejam investigadas. Por outro lado, lesões severas podem ser notadas em animais relativamente saudáveis, (BARKER et al., 1993).

O acentuado acúmulo de células inflamatórias, principalmente na mucosa e submucosa intestinal, desencadeia a chamada síndrome da má absorção, o que diminui a assimilação de nutrientes, reduz a eficiência produtiva e causa o declínio da condição corporal, (CHIODINI et al. 1984; CLARKE, 1997).

### **3.4.7 Diagnóstico**

O diagnóstico da paratuberculose é baseado na observação dos sinais clínicos típicos, identificação do MAP em amostras de fezes através da microscopia (coloração para evidenciação de BAARs), do isolamento do agente em meio de cultivo específico ou pela detecção de DNA da micobactéria. Na necropsia, podem ser observadas lesões características da doença no intestino. Além da demonstração de BAARs em esfregaços, histologia e/ou isolamento de MAP em cultivo bacteriano específico para confirmação de diagnóstico laboratorial (OIE, 2012).

A caracterização da enfermidade também pode ser através da detecção da resposta imune do hospedeiro contra o agente bacteriano. Dos métodos sorológicos, o ELISA e a imunodifusão em gel de ágar são considerados os testes mais sensíveis no diagnóstico da infecção subclínica (COLLINS, 1996; STABEL, 1998).

Outras técnicas de diagnóstico incluem fixação de complemento (COLGROVE et al.(1989), citado por POESTER, 1994.); Ensaio imunoenzimático e o teste interferon gama (STABEL,1997). A eleição de uma determinada técnica laboratorial depende das circunstâncias e do grau de sensibilidade diagnóstica necessária para detecção da infecção em nível individual ou de rebanho (OIE, 2012).

### **3.4.8 Achados de Necropsia**

Os achados macroscópicos mais específicos ocorrem no intestino delgado, entretanto nos casos mais graves, as lesões se estendem desde o duodeno até o reto (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; CHIODINI et al., 1984; JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007), caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, em que a serosa adquire aspecto cerebroide e/ou anelado devido à formação de rugas e pregas transversais na mucosa e aspecto microgranular em sua superfície.

Os linfonodos mesentéricos encontram-se edematosos, aumentados de tamanho e ao corte, protui e flui grande quantidade de líquido leitoso (CLARKE 1997; JUBB et al., 2007). A linfangite é um achado importante e é específico o suficiente para justificar o diagnóstico da paratuberculose à necropsia (JUBB et al., 2007).

### **3.5 Testes Sorológicos**

Os testes mais comumente usados para diagnóstico da paratuberculose são: o teste de Fixação do Complemento (FC), o teste de Imunodifusão em Ágar Gel (IDAG), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Manual, 1996; Van Maanen et al., 2002). E para detectar a imunidade celular utiliza-se o teste de interferon gama (OIE, 2012).

No entanto, nenhum deles é considerado sensível o suficiente para detectar a infecção subclínica (LILENBAUM et al., 2007; OIE 2012).

#### **3.5.1 Cultivo Bacteriano**

O teste diagnóstico mais utilizado e considerado gold standart (OIE 2012), na detecção de animais infectados é o isolamento e cultivo do agente a partir de fezes ou tecidos, este último em casos de biópsia ou necropsia. É um procedimento muito demorado, pois requer várias etapas no processamento das amostras, além de um período de incubação de 8 a 16 semanas (GOMES, 2002).

O sucesso do isolamento do MAP depende de vários fatores, como a composição do meio de cultura, a natureza da amostra clínica (sangue, fezes, leite, tecidos), o uso ou não de um protocolo de descontaminação, o estágio (recente ou avançado) e a forma (clínica ou subclínica) da infecção (TIMMS et al. 2011). No cultivo bacteriano são comumente utilizados os meios de Herroldeggyolkmedium (HEYM), meio de Dubbos modificado, Middlebrook e Löwenstein-Jensen acrescidos com micobactina (JORGENSEN, 1984; OIE, 2012).

### **3.5.2 Histopatologia**

A doença de Johne possui duas classificações, em animais com sinais clínicos da enfermidade as lesões histológicas possuem forma tuberculoide ou “paucibacillary”, no qual o infiltrado inflamatório, principalmente na mucosa e submucosa do intestino delgado, é composto de linfócitos e alguns macrófagos contendo poucas micobactérias, que está relacionada à marcada resposta imune celular e corresponde ao início ou à fase latente da infecção. Na forma lepromatosa ou “multibacillary” há intensa infiltração granulomatosa com formação de células gigantes de Langhans que contém inúmeros BAARs na mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso e, está associada à forte resposta humoral (CHIODINI et al., 1984b; PÉREZ et al., 1996; CLARKE, 1997; CORPA et al., 2000).

### **3.6 Tratamento**

Não há tratamento comprovado contra a paratuberculose (NRCNA, 2003). Normalmente, o tratamento é antieconômico, possuindo um custo que, muitas vezes, supera o valor do animal. Além disso, na maioria dos casos, as melhoras desaparecem quando cessa o tratamento (LARSEN et al.,(1950), citados por RODIEGUES, 2005; GOMES, 2002; BLOOD et al.,1991).

### **3.7 Controle e Profilaxia**

O controle requer tempo e adoção de medidas que satisfaçam as condições do rebanho afetado ( JOHNSON –IFEARULUNDU, 1997).

A identificação da potencial fonte de infecção, assim como a determinação das rotas de transmissão, são peças fundamentais no controle desta enfermidade (HARRIS e BARLETTA, 2001).

As medidas de controle mais frequentemente preconizadas se referem à rotina de higiene das instalações após cada ordenha, à separação de bezerros de animais adultos e à não alimentação dos bezerros com colostro e leite proveniente de vacas infectadas, bem como a realização de testes semestrais para de identificação dos animais reativos, descarte e abate de vacas com sinais clínicos (CHIODINI et al., 1984).

A indústria de inseminação artificial também adota medidas de profilaxia para que a doença não constitua ameaça, como a aquisição de touros somente de rebanhos livres de paratuberculose, coleta de sêmen livre de contaminação, realização de culturas de fezes de todos os touros a cada seis meses. Assim como, isolamento dos reprodutores positivos na cultura e eliminação do seu sêmen estocado depois da última cultura negativa (Ramos et al., 1986).

Um programa de vacinação pode ser uma alternativa em determinados países, porém, não têm sido alcançadas formulações de vacinas que forneçam proteção a todos os animais do rebanho, que previna a eliminação de MAP ou ainda, que confira total proteção contra a infecção. As vacinas frequentemente causam a formação de grandes granulomas no local da inoculação (WINDSOR & EPPLESTON, 2006) e induzem às reações cruzadas com anticorpos contra tuberculina bovina. Sua maior desvantagem é a forte interferência nos resultados dos testes imunológicos o que impossibilita a distinção entre animais com paratuberculose e tuberculose bovina (MUSKENS et al., 2002; OIE, 2012) e com isso, pode interferir no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (MAPA, 2006).

### **3.8 Saúde Pública**

A importância da doença de Johne não se restringe somente as perdas econômicas causados à indústria animal, mas também a possível participação do MAP na íleo-colite granulomatosa que afeta os seres humanos, conhecida como doença de Crohn (YAMASAKI et al. 2013). Neste contexto, pesquisadores têm relatado a presença de MAP no leite cru e pasteurizado (GRANT et al. (2002); AYELE et al. (2005); SLANA et al. (2009); OKURA et al., 2012); além disso, a micobactéria foi detectada no sangue de pacientes com a doença de Crohn (NASER et al. 2004). Similaridades entre a paratuberculose e a doença de Crohn, foram observadas por DALZIEL em 1913, e posteriormente por CROHN et al. em 1932.

A doença de Crohn é considerada, uma enfermidade sistêmica, caracterizada por um processo inflamatório crônico, transmural e recidivante. Provoca a formação de úlceras, espessamento da parede intestinal e formação de fístulas em várias partes do trato gastrointestinal de humanos (CLARKE, 1997; SELBY, 2000). Possui similaridades patológicas com a forma tuberculóide (paucibacillary) da paratuberculose no que diz respeito às

alterações crônicas granulomatosas não caseosas das lesões que acometem a parede intestinal e tecidos linfóides adjacentes (CLARKE, 1997).

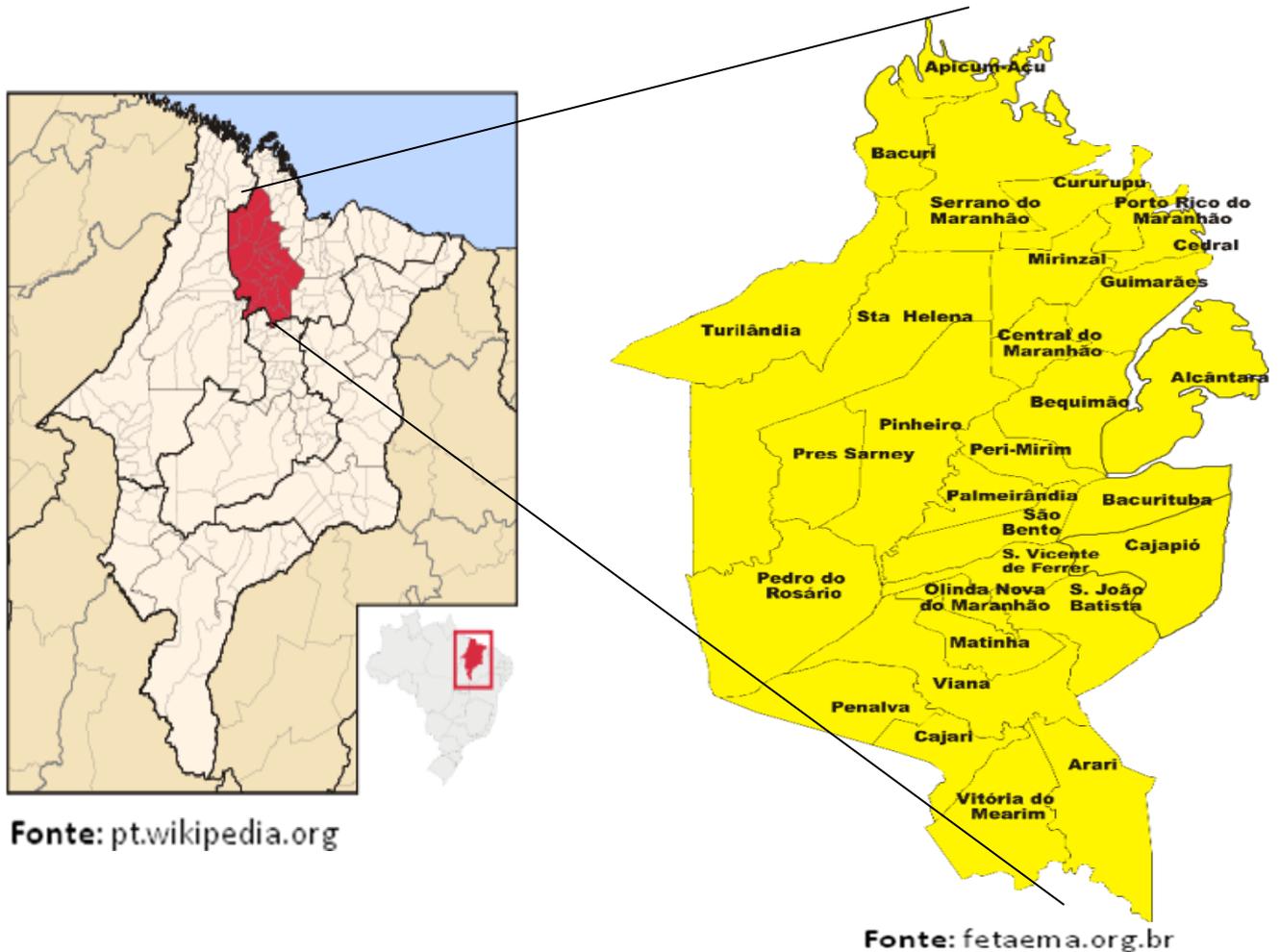
Tratamentos com drogas imunossupressoras e remoção cirúrgica da porção intestinal afetada são recomendados para controlar os sintomas da doença de Crohn, porém não se conhecem métodos curativos da enfermidade. Apesar de sua etiologia ser desconhecida, evidências epidemiológicas indicam que a exposição de indivíduos geneticamente susceptíveis durante a infância, a fatores microbiológicos, químicos e/ou ambientais, favorecem o desenvolvimento da doença. É de grande necessidade um estudo epidemiológico amplo, com técnicas moleculares rigorosas para desvendar a real causa da doença de Crohn e determinar se o MAP tem significado etiológico primário ou se é apenas um invasor secundário (CLARKE, 1997).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Área de estudo**

A Baixada Maranhense está inserida na Mesorregião Norte Maranhense, limitando-se ao Norte com o litoral e o Oceano Atlântico, ao Sul com a região dos cocais, a Leste com a região pré-Amazônica e ao Oeste, com o cerrado. Possui uma área total de 331.936,948km<sup>2</sup> e está dividida em 21 municípios: Anajatuba, Arari, Bela Vista do Maranhão, Cajari, Conceição do Lago Açu, Igarapé do Meio, Matinha, Monção, Olinda Nova do Maranhão, Palmeirandia, Pedro do Rosário, Penalva, Peri-Mirim, Pinheiro, Presidente Sarney, Santa Helena, São Bento, São João Batista, São Vicente de Ferrer, Viana e Vitoria do Mearim.

Localizada sob as coordenadas 01°59'-04°00''S; 44°00'-45°33''W, abrangendo uma área total de 17.579,366 Km<sup>2</sup>, (IBGE, 2014), a região constitui uma ampla diversidade de ricos ecossistemas, tais como rios, lagos, estuários e áreas alagáveis, fazendo parte da Amazônia Legal Brasileira. (VASCONCELOS, 2012).



**Figura 1.** Mapa ilustrando os municípios da Baixada maranhense.

O rebanho bubalino Maranhense possui 80.212 cabeças, sendo que a Baixada é a região de maior concentração do rebanho com 59.154 cabeças, representando 73,74 % do efetivo bubalino do Estado (IBGE 2014).

#### 4.2 Amostragem

Foram coletadas 115 amostras (n= 66 fêmeas) e (n= 49 machos) de búfalos com idade acima três anos, das raças de Murrah, Mediterrâneos e seus mestiços, sem sinais clínicos, abatidos nos Matadouros de Viana - MA e Arari – MA, pois estes matadouros são os que abatem um número significativo de búfalos provenientes de outros municípios da baixada maranhense.

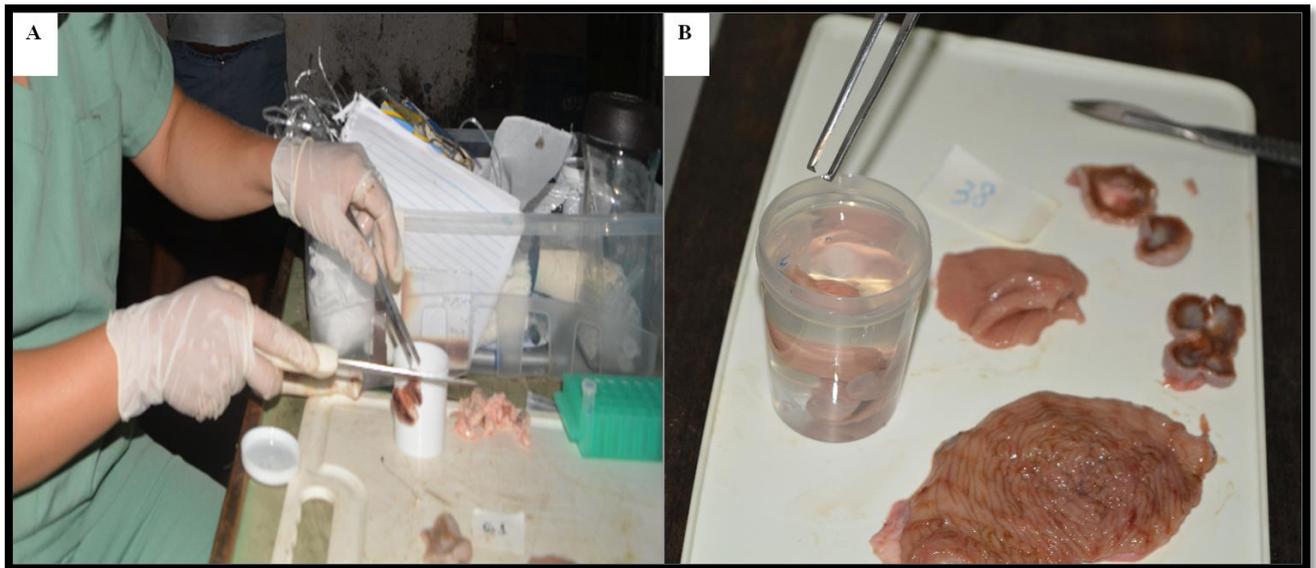
Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, conforme protocolo nº 21/2014, para a execução da pesquisa.

Essas amostras foram classificadas como amostras por conveniência em razão da disponibilidade de animais a serem abatidos. Isto pode ser explicado devido ao fato do baixo consumo da carne de búfalo pela população local, implicar em uma redução significativa no abate desses animais.

### 4.3 Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas entre os meses de agosto a dezembro de 2015, onde foram coletadas amostras de fezes e tecidos dos linfonodos mesentéricos, intestinos delgado e grosso dos animais, fixadas em solução de formol a 10%, armazenadas em recipientes separados e identificados para posterior realização dos protocolos de bacterioscopia ( Figura 2).

### 4.4 Histologia



**Figura 2.** Coleta dos tecidos de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso (A); Armazenamento e fixação em formol a 10% dos fragmentos de tecidos de búfalos abatidos em matadouro de Viana- Ma e Arari- Ma (B).

#### 4.4.1 Processamento dos tecidos para a histopatologia

O processamento dos tecidos dos linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso, foi realizado da seguinte maneira: No laboratório de Anatomopatologia da Universidade Estadual do Maranhão foram efetuados os cortes das áreas de interesse, e os

fragmentos foram colocados em cassetes histológicos rotulados com o mesmo número do frasco. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Após a inclusão, os blocos de parafina foram cortados a 5µm, e retirada dos fragmentos parafinados, as quais são esticadas sobre uma lâmina de vidro. Foram feitas duplicatas de cada lâmina para realização da coloração através da técnica de Hematoxilina Eosina (HE) e Técnica de coloração de Ziehl – Neelsen (ZN).

#### **4.4.2 Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (HE)**

As lâminas com fragmentos de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso, foram coradas pelos métodos usuais de hematoxilina e eosina para identificação de alterações histopatológicas sugestivas de paratuberculose.

Primeiramente foram colocadas no Xilol I e II durante 5 minutos; Álcool absoluto I, II, III por 3 minutos; em seguida lavadas em água corrente e colocadas por 3 minutos na hematoxilina e 30 segundos na eosina, lavadas em água corrente novamente. Procedendo-se colocando em Álcool absoluto III, II, I durante 2 minutos em cada; Xilol I e II durante 2 minutos e depois foram montadas para efetuar a leitura.

#### **4.4.3 Técnica de coloração de Ziehl- Neelsen**

Para iniciar a coloração de Ziehl – Neelsen, as lâminas com fragmentos de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso foram levadas para a estufa durante 30 minutos, para retirar o excesso de parafina e fixação do tecido na lâmina. Em seguida foram colocadas no Xilol I e II durante 5 minutos; Álcool Absoluto I, II, III durante 3 minutos cada, e lavadas em água corrente por 5 minutos. Após esse procedimento, a lâmina foi recoberta pelo corante fucsina fenicada e aquecida durante 5 minutos, até liberar vapores sem chegar a ferver. Após serem lavados com água destilada, fez-se a descoloração com solução de álcool - ácido durante 1 minuto. Passaram-se novamente pela lavagem com água destilada e secagem com papel toalha, procedeu-se recobrindo a lâmina com o azul de metileno durante 30 segundos, lavagem com água destilada posteriormente e secagem com papel toalha, para dar início a outra etapa de coloração com álcool absoluto III, II, I durante 2 minutos cada, Xilol II, I por 2 minutos. Após a secagem foram montadas e levadas para a leitura. A coloração foi realizada conforme descrito por Luna (1968); utilizou-se fucsina fenificada comercial (LABORCLIN).

#### 4.4.4 Isolamento bacteriano

Isolamento bacteriano foi feito a partir de amostras fecais. Cerca de 100g de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, imediatamente refrigeradas e transportadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas - LDDI da UEMA.

Após a homogeneização, 1,5 a 2 gramas de fezes foram diluídas em 35 mL de água destilada estéril em um tubo tipo falcon 50 ml com tampa e submetidos à agitação e ficar em processo de sedimentação por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, transferiu-se 5ml do sobrenadante para novo tubo tipo falcon 50 ml e foi encaminhado para a centrifuga a 2800 rpms por 15 mim. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 25 mL de solução descontaminante de cloreto de hexadecil piridínio à 0,9% (HPC – Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) manteve-se por 18 h em temperatura ambiente. Foram novamente centrifugados e descartado todo sobrenadante, o sedimento foi resuspenso em 1ml de solução antimicrobiana (2000 mg vancomicina, 2000 mg ácido nalidíxico e 3 mg anfotericina B) e mantido a 37° C em estufa por 18h. Semeou-se 0,1ml da mistura em meio de cultivo específico de Herrold com gema de ovo (HEYM - Herrold egg yolk medium) contendo micobactina J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO, EUA) para proporcionar o crescimento da micobactéria (STABEL, 1997). Os meios foram mantidos em estufa a 37°C por um período de 6 meses no LDDI da UEMA, sob observação quinzenal.

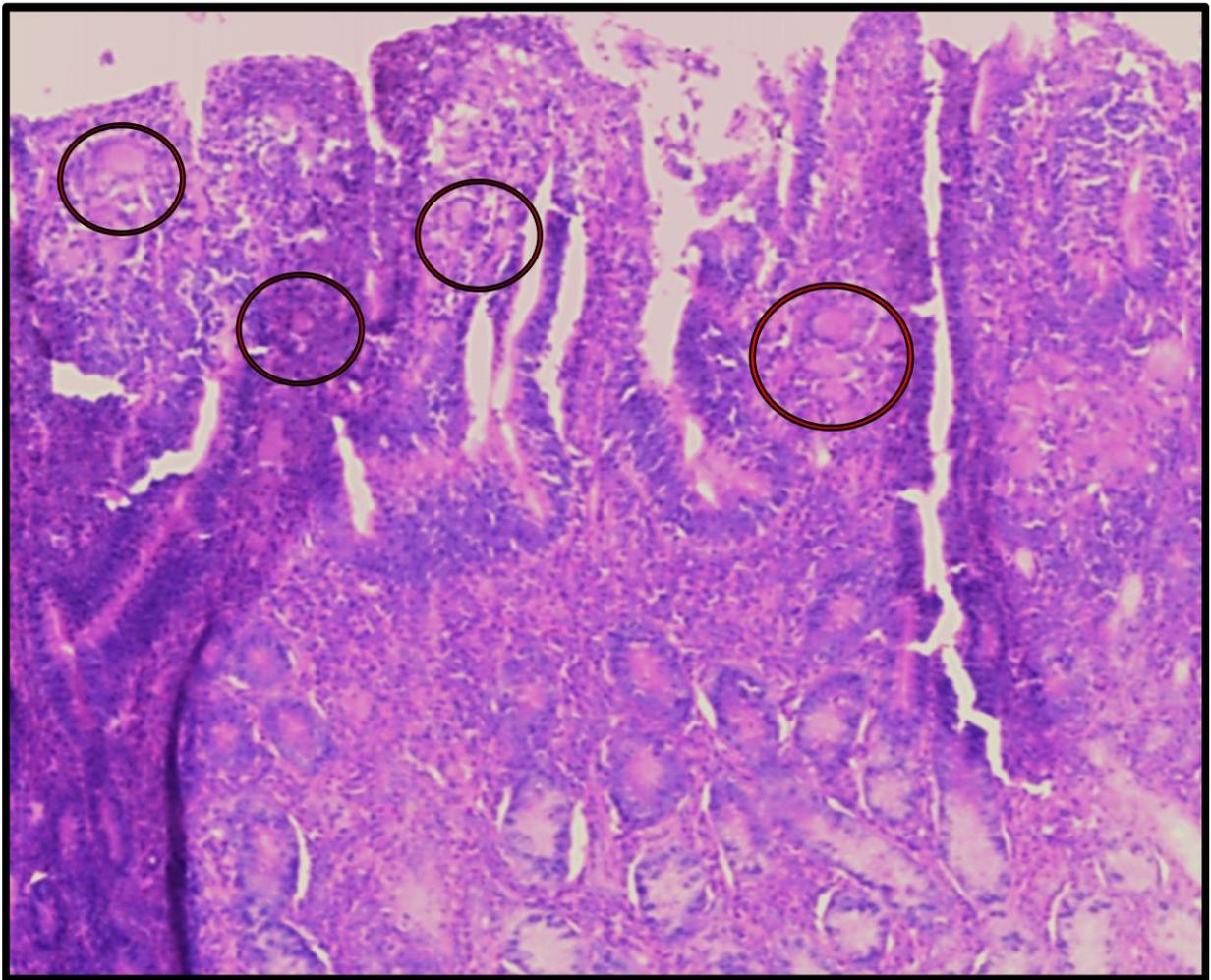
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram evidenciadas alterações histopatológicas sugestivas de paratuberculose, no intestino delgado, porção final do intestino grosso (colón) e linfonodos mesentéricos através das técnicas de HE, em 27% (31/115) dos búfalos abatidos, e foram confirmadas na coloração de Ziehl-Neelsen, com a identificação de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAARs) em 23% (26/115) das amostras avaliadas.

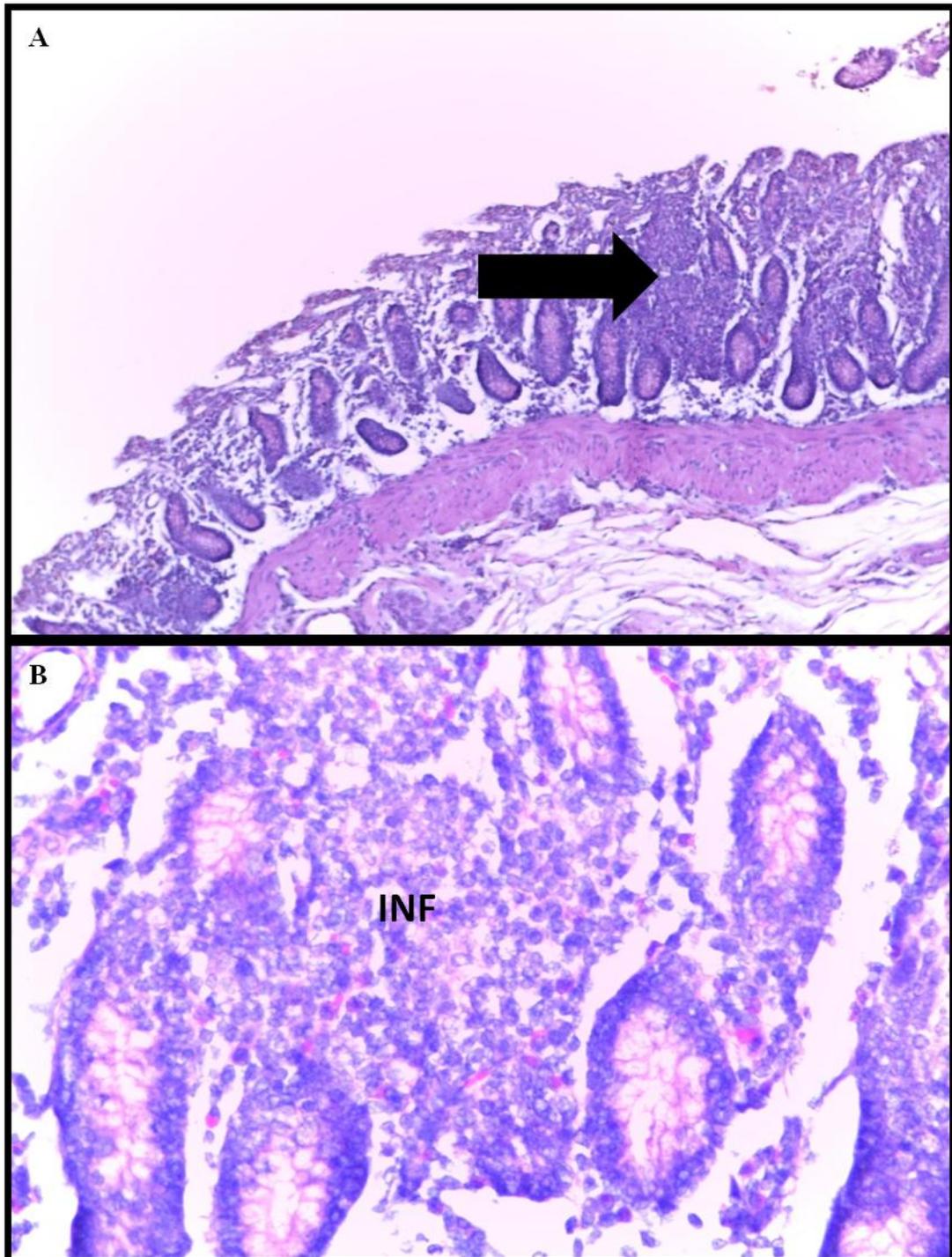
### 5.1 Histopatologia

No intestino delgado foram encontradas lesões caracterizadas por infiltrado inflamatório granulomatoso composto por macrófagos epitelióides repleto de células gigantes tipo Langhans na mucosa, e infiltrado mononuclear na submucosa (Figura 3 e Figura 4). Essa

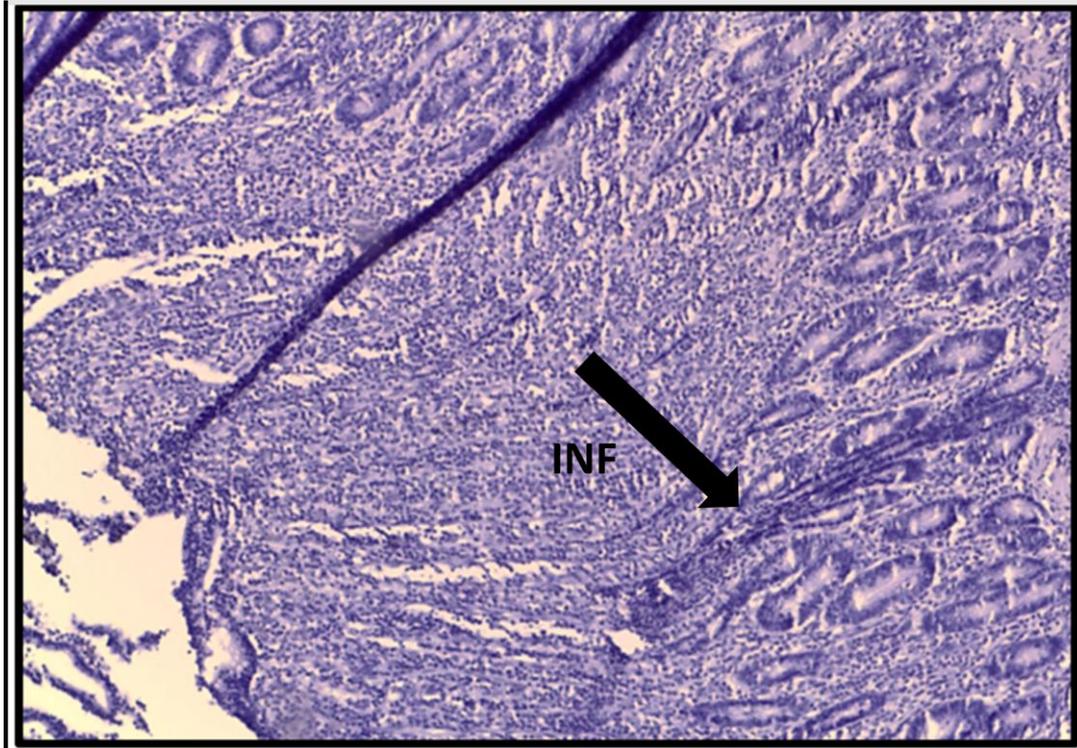
infiltração de macrófagos na mucosa e submucosa acompanhados da visualização de BAAR à coloração de Ziehl-Neelsen é semelhante aos encontrados por Barbosa et al. (2015) e Brito, (2015) em búfalos com paratuberculose nos municípios de São Mateus – MA e São Luís – MA, com atrofia e fusão de vilosidades no intestino delgado de forma acentuada e multifocal também foram observadas (Figura 5).



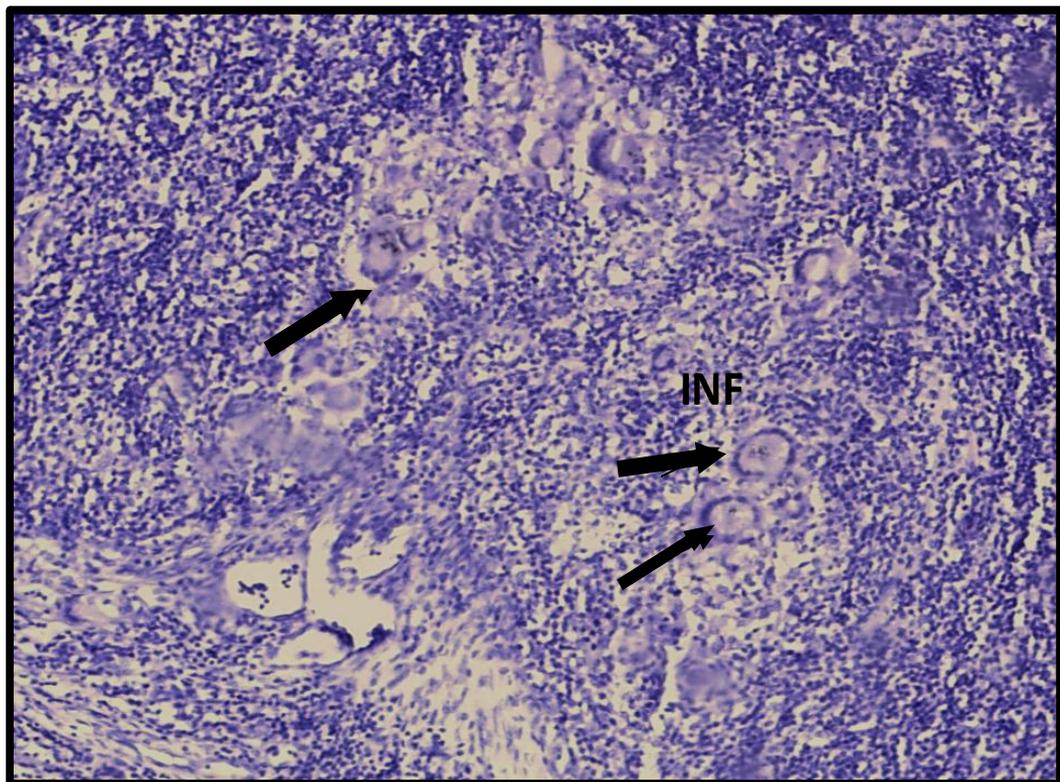
**Figura 3.** Fotomicrografia do intestino delgado de búfalo, evidenciando aglomerado de células gigantes na mucosa (Círculos). Hematoxilina e eosina. 20x



**Figura 4.** (A) Fotomicrografia do intestino delgado (jejuno) de búfalo, evidenciando lesão granulomatosa com intenso infiltrado (**setas**) de células, macrófagos epitelióide e células gigantes na mucosa. Hematoxilina e eosina. 40x (B) Infiltrado inflamatório (**INF**) granulomatoso, neutrófilos, eosinófilos, células gigantes. Hematoxilina e eosina. 100x



**Figura 5.** Fotomicrografia do intestino delgado (jejuno) de búfalo, evidenciando infiltrado (INF) inflamatório de macrófagos epitelioides e células gigantes, com atrofia e fusão das vilosidades (seta). Hematoxilina e eosina. 20x



**Figura 6.** Fotomicrografia de linfonodo mesentérico de búfalo, evidenciando o infiltrado (INF) difuso acentuado de macrófagos epitelióides e células gigantes tipo Langhans ( setas ). Hematoxilina e eosina. 20x

Os folículos linfóides das placas de Peyer, válvula ileocecal e intestino Grosso apresentavam infiltração inflamatória de macrófagos e células gigantes. O comprometimento primário da porção final do intestino delgado, pode estar associado ao fato de que as placas de Peyer do íleo contém aproximadamente 1 a 2% de células T, e as do jejuno cerca de 30 a 50% (MIYASAKA et al., 1983). A reduzida presença de células T no íleo, capazes de efetuar a imunidade celular, sugere que as placas de Peyer desta região, as quais já são bem desenvolvidas em ruminantes jovens, é um ambiente relativamente favorável para a micobactéria (YAMASAKI et al., 2010). Como já citado por Juste et. al., 1994 a tolerância imune local ao organismo tem sido também sugerida, como mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção em placas de Peyer, o que pode ser evidenciado na porção terminal do íleo, onde abriga relativamente grande população de micobactérias saprofitas em ruminantes, o que poderia inclusive, sugerir reduzida imunidade local (LEPPER; WILKS, 1988). Além disso, é aceitável que a diminuição progressiva à susceptibilidade ao MAP com o aumento da idade, está relacionada, concomitantemente, a involução das placas do íleo e consequente desaparecimento de ambiente favorável para a persistência micobacteriana (REYNOLDS; MORRIS, 1983; CLARKE, 1997).

O “aspecto lepromatoso” das lesões histológicas quando a infiltração inflamatória é difusa na mucosa, como já descrito Yamasaki et al. (2010), condiz com a distribuição das lesões por nós observadas em todos os animais, muito embora esse termo, como também as descrições utilizadas para a aparência tuberculóide, são comumente utilizadas para as lesões necróticas caseosas observadas com frequência no intestino de pequenos ruminantes com paratuberculose (GARCIA-MARTIN, 1990).

A tentativa de destruição dos bacilos pelos macrófagos e simultânea multiplicação do agente em seu interior, resulta na liberação de fatores solúveis os quais continuam a recrutar células inflamatórias. Células gigantes, às vezes, são formadas como parte da reação de hipersensibilidade do tipo retardado, que causa a agregação e retenção de macrófagos, comprometimento da vascularização e drenagem linfática, além de alterar a conformação normal do tecido afetado (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984).

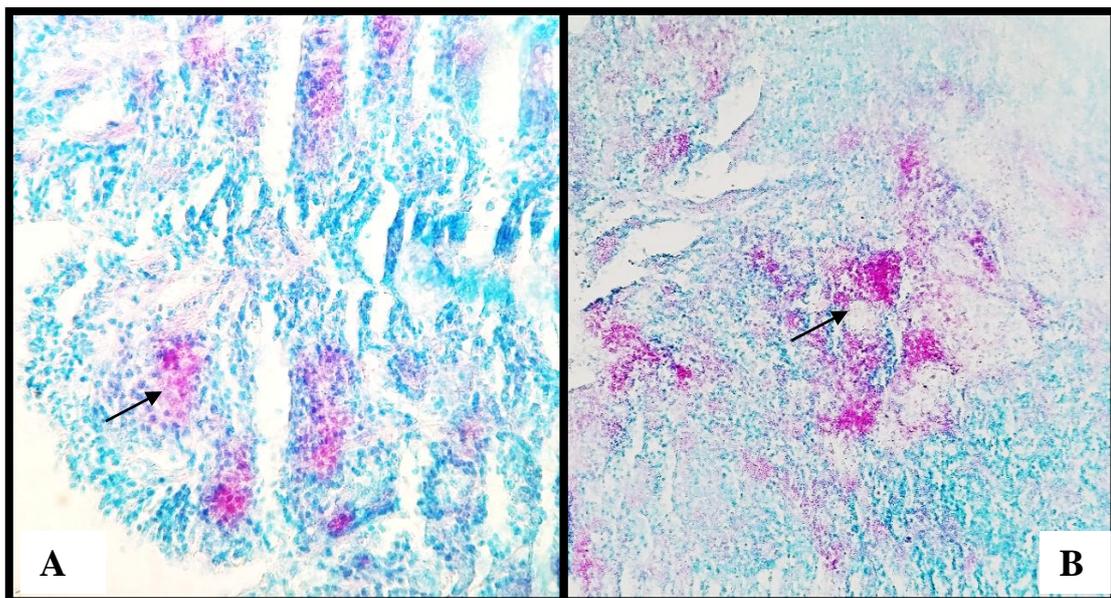
Não se sabe exatamente o porquê da progressão de alguns casos, após anos de incubação, para a forma clínica ‘multibacilar’ da paratuberculose. No entanto, acredita-se que a supressão ou queda da imunidade celular-mediada é um fator que desencadeia a proliferação micobacteriana e a eliminação fecal do agente (CLARKE, 1997).

Nos linfonodos mesentéricos foram observadas células epitelióides e células gigantes na região cortical e medular (Figura 6). A linfadenite mesentérica granulomatosa rica

em macrófagos epitelióides e células gigantes, estavam presente em animais deste estudo, por vez já relatada em bovinos e bubalinos por diversos autores (DALTO et al., 2012; SCHILD et al., 2015).

## 5.2 Bacterioscopia

O diagnóstico através da coloração de Ziehl- Neelsen (ZN) para identificação do BAAR em tecidos de duodeno, jejuno, íleo e linfonodo mesentérico, mostrou-se satisfatória nesta pesquisa. Entretanto, cinco animais que apresentaram lesões de paratuberculose subclínica quando corados em Hematoxilina e Eosina (HE) apresentaram-se negativos quando submetidos a técnica de coloração de ZN. Este fato pode ser justificado pelo segmento de tecido que foi analisado, que nesta região, podem ser visualizadas lesões leves, e que geralmente a carga bacteriana é mais baixa, devido à possíveis mudanças na parede celular durante a preparação de tecidos e pelo processamento, e devido a isso, muitos organismos não consegue corar com a fuscina dificultando a visualização da bactéria (CONDRON et al., 1995; CLARKE e LITTLE, 1996). O mesmo foi relatado por Mota et al., 2010 e Dalto et al., 2012, onde cinco búfalos com lesões de paratuberculose, apresentaram-se negativos quando corados pela técnica de ZN. Podendo assim diagnosticar que, quando a carga bacteriana é baixa, os bacilos podem não ser detectados no exame microscópico, o que poderia explicar os resultados negativos à coloração de Ziehl-Neelsen e positivos em outras técnicas (Figura 7).



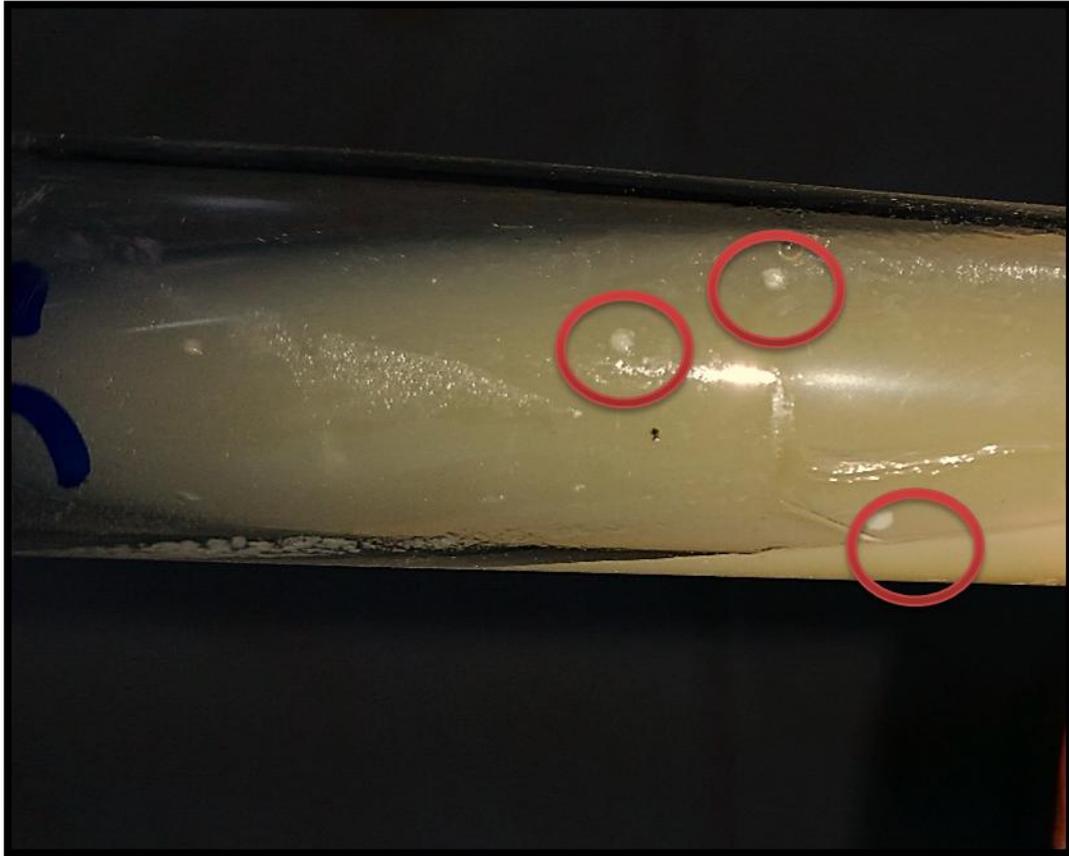
**Figura 7.** (A) Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado ( íleo) de búfalo, com numerosos bacilos álcool-ácido resistentes (seta). Ziehl—Neelsen.40x; (B) Fotomicrografia do linfonodo mesentérico com presença de numerosos bacilos álcool- ácido resistentes (seta). Ziehl- Neelsen. 40x

### 5.3 Isolamento bacteriano

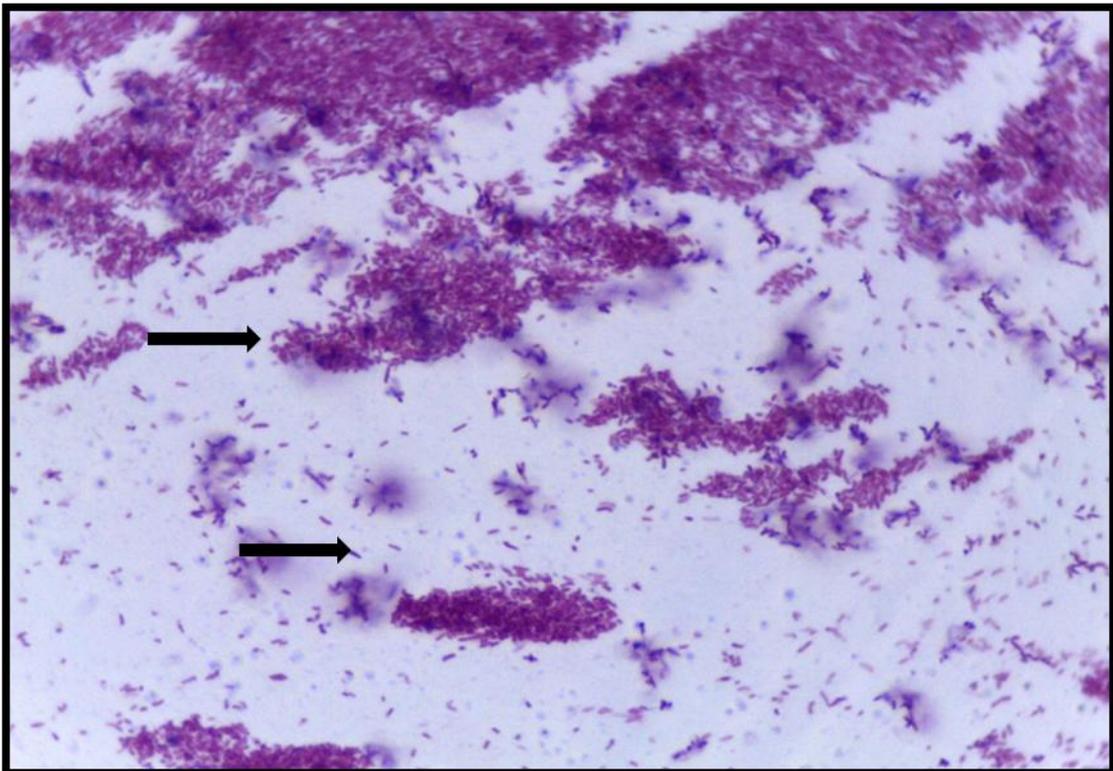
No isolamento bacteriano feito a partir das 26 amostras fecais dos animais que apresentaram bacilos álcool – ácido resistente nos tecidos analisados, cinco (19, 2%) revelaram características compatíveis com o MAP no cultivo em meio HEYM, com antibiótico. Foi possível observar colônias redondas, brancas, lisas e levemente rugosas, coloração álcool-ácido e crescimento lento com 8 semanas de incubação e dependência de micobactina. O tempo de crescimento das colônias compatíveis com o MAP em amostras de fezes variam entre 8 a 12 semanas, os achados foram semelhantes aos relatados por SIVAKUMAR et al. (2005) na Índia, que detectaram seis búfalos positivos no cultivo bacteriológico, depois de 12 semanas de incubação ( Figuras 8, 9 ).

As 21 amostras restantes não houve crescimento do agente após 24 semanas de cultivo e ou a contaminação inviabilizou a observação de colônias típicas de MAP.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que cultivo fecal possui uma relativa sensibilidade quando utilizado como método de diagnósticos na identificação de bubalinos na fase subclínica da paratuberculose, favorecendo dessa forma, a maior eficiência das medidas de controle, reduzindo a infecção de novos animais e disseminação da infecção no rebanho (OIE, 2012). O diagnóstico da doença subclínica é difícil, devido à baixa sensibilidade dos testes desenvolvidos até agora. Os exames imunológicos e moleculares podem não identificar todos os animais infectados, gerando falso-negativos e, além disso, eles podem dar um número considerável de resultados falso-positivos (COUSSENS, 2004). Isso é especialmente verdade na fase inicial da doença, quando imunoglobulinas específicas são produzidas em quantidades indetectáveis (SHIN et al., 2004; LILENBAUM; MARASSI; OELEMANN, 2007). Em rebanhos altamente infectados, alguns animais adultos podem ingerir grandes quantidades da micobactéria juntamente com alimentos e/ou água, eliminá-las nas fezes e esses serem detectados no cultivo. Ainda há dúvidas quanto à infecção logo após a ingestão da micobactéria, alguns autores acreditam que esses animais adquirem a infecção; no entanto, necessitam de longo tempo, tanto, para eliminar o agente nas fezes em quantidade suficiente para serem detectados pelo cultivo, quanto para desenvolver as lesões intestinais e apresentarem os sinais clínicos da paratuberculose (WHITLOCK et al., 2000).



**Figura 8.** Fotografia de um cultivo para isolamento do MAP, onde se observa Colônias bacterianas típicas de *Mycobacterium Avium subsp. paratuberculosis* em meio Herrold com micobactina, de amostras fecais de búfalos.



**Figura 9.** Visualização de Bacilos álcool ácido-resistentes ( setas ) isoladas em meio Herrold com micobactina, de amostras fecais de búfalos. 40x

Os registros encontrados de paratuberculose em búfalos, incluem Itália (LILLINI et al., 1999) e Índia (SIVAKUMAR et al., 2006) onde a incidência registrada foi de 3,6% (KULSHRESTHA et al. (1980), citado por MOTA et. al., 2010), país em que a doença é responsável por consideráveis perdas econômicas relativas a reduções na produção de leite e carne. No Brasil, apesar de vários relatos da enfermidade em bovinos, pesquisas de paratuberculose em búfalos só foram registrados em duas regiões do país: o primeiro caso foi descrito na região nordeste, estado de Pernambuco por Mota et al. (2010), em seguida por DALTO et al. (2012) relataram um rebanho bubalino infectado por MAP na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul, posteriormente por Barbosa et al. (2015) no estado de Maranhão.

Os resultados do presente estudo superou resultados de Sivakumar et al. (2006) na Índia e Barbosa et al. (2015) no estado do Maranhão, pode-se associar este fato ao tipo de criação presente na maior parte do rebanho Maranhense, onde predomina a criação extensiva dos búfalos principalmente na baixada maranhense, local que foi realizada a pesquisa, ou seja, não há controle sanitário e zootécnico e ao menos segregação dos animais por faixa etária, favorecendo transmissão do MAP para os animais jovens, uma vez que a infecção ocorre nos primeiros dias de vida (STABEL, 1998).

Outro fator que pode está contribuindo para a propagação da paratuberculose no rebanho estudado é a presença de grande aglomeração desses animais lagos rasos formados no período da estiagem na baixada maranhense. Esses animais permanecem praticamente o dia inteiro, alimentando-se e despejando suas excretas nesses locais, facilitando a transmissão do (MAP) via oro-fecal, sobretudo, das fêmeas para os animais jovens no momento da amamentação. Essa peculiaridade inerente a baixada maranhense favorece manutenção e disseminação do agente nessa região.

**Tabela 1.** Comparação das amostras submetidas a análise bacterioscópica, quanto ao diagnóstico da paratuberculose em búfalos abatidos nos matadouros de Viana- MA e Arari- MA, 20016. (OLIVEIRA, 2015 modificado).

<b>Nº</b>	<b>Animais com alterações anatomopatológicas</b>	<b>Ziehl-Neelsen</b>	<b>Isolamento fecal</b>
1-	05	+	-
2-	06	+	-
3-	07	+	+
4-	10	+	-
5-	11	+	-
6-	13	-	-
7-	15	+	-
8-	16	-	-
9-	20	+	-
10-	21	+	-
11-	22	+	-
12-	24	+	-
13-	25	+	+
14-	26	+	-
15-	27	+	-
16-	29	+	-
17-	30	+	+

18-	31	+	-
19-	32	+	+
20-	33	+	+
21-	34	+	-
22-	35	+	-
23-	45	-	-
24-	47	+	-
25-	50	-	-
26-	60	+	-
27-	64	+	-
28-	66	-	-
29-	83	+	-
30-	85	+	-
31-	90	+	-

**(+) Positivo ao teste; (-) Negativo ao teste.**

## 6. CONCLUSÕES

Podemos concluir com base nos resultados obtidos que:

Foram encontradas lesões características de paratuberculose em fragmentos de tecidos do intestino delgado, intestino grosso e linfonodos mesentéricos;

Foi possível identificar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em fragmentos /de intestinos e linfonodos afetados;

O MAP foi isolado a partir de cultivo fecal de búfalos;

Há ocorrência de paratuberculose subclínica nos rebanhos bubalinos da Baixada Maranhense;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACYPRESTE, C. S., **Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-Myobacterium paratuberculosis em vacas em lactação.** Ciência Animal Brasileira, v. 6, n.1, p. 55-59, 2005.

BARBOSA J.D.; BRITO M.F.; JUNIOR A.A.F.; JUNIOR P.S.B.; LEITE R.C.; MOTA R.A.; UBIALI D.G. **Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos.** Pesquisa Veterinária Brasileira 35(10):823-828, 2015.

BUERGELT, C. D. et al. **In vitro lymphocyte transformation as a herd survey methods for bovine paratuberculosis.** American Journal of Veterinary Research, v. 39, p. 501-595, 1978.

BERNARDES, O. **Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica.** RevBrasReprodAnim,v.31,n.3,p.293298,2007.<<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/293.pdf>> 08 Out. 2012.

BERNARDES, O. **O búfalo no Brasil. In: Encontro de Búfalos das Américas,** 4, 2006, Medellín, Colômbia. Memórias ... Medellín: [s.n.], 2006. p.14-19.BRASIL.

BERNARDI, Cristina Costa. **Conflitos sócio-ambientais decorrentes da bubalinocultura em territórios pesqueiros artesanais: o caso Olinda Nova do Maranhão .** Orientadora: Sueli Corrêa de Faria , 2005.

BEHR M.A., COLLINS D.M. **Paratuberculosis: Organism, disease, control.** CAB international, Cambridge, 375p, 2010.

BUERGELT, C. D. et al. **In vitro lymphocyte transformation as a herd survey methods for bovine paratuberculosis.** American Journal of Veterinary Research, v. 39, p. 501-595, 1978.

COELHO, A. C., COELHO, A. M., PINTO, M. DE LURDES., RODRIGUES, J. **Diagnóstico de paratuberculose ovina. Rev. Portuguesa de ciências veterinárias- RPCV (2007),102 (563-564) 305-313.**

CLARK Jr D.L., KOZICZKOWSKI J.J., RADCLIFF R.P., CARLSON R.A. & ELLINGSON J.L.E. 2008. **Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction.** J. Dairy Sci. 91:2620- 2627.

CHIODINI, R. J. et al. **Possible role of mycobacteria in inflamatory bowel disease.** Digestive Disease and Sciences, v. 29, p.1073-1079, 1984.

CHIODINI, R.J., HERMON-TAYLOR, J. **The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5:629-631, 1993

COLLINS, D. M. et al. **Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction.** The Veterinary Record, v. 133, p. 599-600, 1993.

COLLINS, M.T. et al. **Evaluation of five antibodies detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, n. 6, p. 685-692, 2005.

COCITO, C. et al. **Paratuberculosis.** *Clinical Microiology Review*, v. 7, p. 328-345, 1994.

COUSINS, D. V.; EVANS, R. J.; FRANCIS, B. R. **Use of BACTEC Radiometric culture medium and polymrase chain reaction for the rapid screening of ruminant faeces and intestinal tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*.** *Australian Veterinary Journal*, v. 72, p. 458-62, 1995.

COUSSENS, P. et al. **Host pathogen interactions and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International. Cap. 11, 2010.

CORPA, J. M. et al. **Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats**. Journal of Comparative Pathology, v. 122, p. 255-265, 2000.

CUNHA P.H.J., MARTINS A.F., FIORAVANTI M.C.S., BRITO L.A.B., ARAÚJO E.G., Silva L.A.F., Rabelo R.E. & Jardim E.A.G.V. **Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso**. Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Botucatu, p.118, 2003.

DACORSO-FILHO, P. et al . **Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais**. Arquivos do Instituto Biológico Animal, v. 3, p. 129-139, 1960.

DALTO A.C., BANDARRA P.M., PAVARINI S.P., BOABAID F.M., BITENCOURT A.P.G., GOMES M.P., Chies J., DRIEMEIER D. & CRUZ C.E.F.. **Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes**. Trop. Anim. Health Prod. 44:1-5. 2012.

DAMÉ, M.C.F. **Búfalo: animal de tração**. Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 24p.

DIAS, L. D. et al. (2002) **Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose**. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFMG, 11., 2002, Belo Horizonte. Anais eletrônico... Belo Horizonte: UFMG, 2002.

DRIEMEIER D., CRUZ C.E.F., GOMES M.J.P., CORBELLINI L.G., LORETTI A.P. & COLODEL E.M. 1999. **Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul**. Pesq. Vet. Bras. 19(3/4):109-115.

DUPONT, O. **Jornal do Comércio do Rio de Janeiro de 05/11/1915, 1915.**

D. YADAV, Singh, S.V., Singh., A.V., Sevilla, I., Pathogenic ‘Bison-type’ *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2008) 373–387

FERREIRA, R., FONSECA, L. S., LILENBAUM, W. **Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 23, n. 4, p. 19-24, 2001.

FONSECA, L. F. L. et al. **Identificação de anticorpos anti- *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo.** *Arquivos da Faculdade Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 51-56, 2000.

FUKUDA S., Hase K. & OHNO H. **Application of a mouse ligated Peyer’s patch intestinal loop assay to evaluate bacterial uptake by M cells.** *J. Vis. Exp.* 58:e3225, 2011.

GOMES, M. J. P., et al. **Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região sul do Brasil.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 30, n. 2, p. 113-118, 2002.

GRANT, I. R. et al. **Effect of higher pasteurization temperatures and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 28, n. 6, p. 461-465, 1999.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação e Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2014. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 19 Nov. 2015.

JOHNE N. & FROTHINGHAM I **Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind.** *Dtsch. Z. Tiermed.* 21:438- 454, 1895.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J.; KANEENE, J. B. **Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review.** Veterinary Bulletin, v. 67, n. 6, 1997.

JORGENSEN, J. B. **The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*.** In:\_\_\_\_. Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Luxembourg: European Communities Agriculture Publication, 1984. p. 131–136.

LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W. M. R. **Paratuberculosis: an update.** Brazilian Journal of Microbiology, v.38, p.580-590, 2007.

MEDEIROS J.M.A., GARINO JÚNIOR F., MATOS R.A.T., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. **Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano.** Pesq. Vet. Bras. 32(8):697-700, 2012.

MOMOTANI, E. et al. **Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 148, n. 1-2, p. 55-68, 2012.

MORAVKOVA M., Hložek P., Beran V., Pavlik I., Preziuso S., Cuteri V. & Bartos M. 2008. **Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues.** Res.Vet. Sci. 85(2):257-264.2008.

MOTA R.A., PINHEIRO JUNIOR J.W., GOMES M.J.P., PEIXOTO R.M., MAIA C.L., BRITO M.F., CHIES J.A.B., SNEL G.G.M., BERCHT S. & JUFFO G.D. . **Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE.** Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 74(2):73-79, 2007.

MOTA, P. M. P. C. et al. **Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a State of Paraíba, Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 29, n. 9, p. 703-706, 2009.

MOTA, R. A. et al. **Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 30, n. 3, p. 237-242, 2010.

MUSKENS, J. et al. **Evaluation of the long term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds.** *Veterinary Microbiology*, v. 86, n. 3, p. 269-278, 2002.

MUNIZ, Lenir Moraes. **A criação de Búfalos na Baixada Maranhense: uma análise do desenvolvimentismo e suas implicações sócio-ambientais.** III jornada internacional de políticas públicas, 2007, p.1-6. Disponível em : <  
<http://www.joinpp.ufma.br/jornadas/joinppIII/html/Trabalhos/EixoTematicoI/Eixo%209%20a117d7fcc8043a5882d91Lenir%20Moraes%20Muniz.pdf> > Acesso em : 03 janeiro 2016.

NAKAJIMA, M.; MAIA, F. C. L.; MOTA, P. M. P. C. **Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO EM MICOBACTÉRIAS, 4., 1991, Bauru. Anais... Bauru: [s.n], 1991.

NIELSEN, S. S.; TOFT, N. **Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques.** *Veterinary Microbiology*, v. 129, p. 217–235, 2008.

NRCNA. NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Diagnosis and control of the Johne's Disease.** Washington, DC: The National Academies Press, 2003.

OIE. **Paratuberculosis (Johne's disease).** Disponível em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.12\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_PARATB.pdf)>. Acesso em 21 Mai 2014.

OLIVEIRA, D. M. et al. **Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba.** In: ENCONTRO NACIONAL DO DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 2003, Mato Grosso do Sul. 2008. Anais... Mato grosso do Sul: [s.n.], 2008.

OLIVEIRA, D. M. et al. **Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2010.

pasteurised cow's milk in Northern Ireland. *The Paratuberculosis Newsletter*, v. 10, p. 5-8, 1998.

OKURA, H.; TOFT, N.; NIELSEN, S. S. **Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis.** *Veterinary Microbiology*, v. 157, p. 253-263, 2012.

PÉREZ, V; GARCÍA-MARÍN, JF; BADIOLA, J.J. **Description and classification of different types of lesion associated with natural classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep.** *Journal of Comparative Pathology*, v. 114, p. 107-122, 1996.

PIMENTEL, M.V.S.; Barbosa, M.M.M.; Andrade, S.C. de; Nascimento, W.G. do. **Evolução da bubalinocultura no Nordeste brasileiro: uma revisão bibliográfica.** In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão- JEPEX, 10, 2010, Garanhuns. Anais... Garanhuns: UFRPE-UAG, 2010.

POESTER F.P., RAMOS E.T. **Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina.** *Ciência Rural* 24:333- 337, 1994.

PORTUGAL, M. A. S. C. et al. **Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina.** *O Biológico*, v. 4, p. 19-24, 1979.

RAMOS, E. T. et al. **Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul.** *A hora Veterinária*, v. 6, n. 34, p. 28-32, 1986.

RISTOW P., MARASSI C.D., RODRIGUES A.B.F., OELEMANN W.M., Rocha F., SANTOS A.S.O., CARVALHO E.C.Q., CARVALHO C.B., FERREIRA R., FONSECA L.S. & LILENBAUM W. **Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil.** *Vet. J.* 174(2):432-434, 2006.

RICHARDS, W.D. **Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 14, p. 587-588, 1981.

ROHDE K.H., ABRAMOVITCH R.B., RUSSELL D.G. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. Cell Host and Microbe 2:352-364, 2007.

SHERMAN, D. M. **What you need to know about controlling Johne's.** Hoard's Dairyman, v. 132, p. 816-817, 1987.

SCHWARZ, D.G.G., CARVALHO, I.A., PEETRELONGA, P.A.G., FARIA, A.G., FARIA, A. C. S., MOREIRA, M.A.S. **Paratuberculose em pequenos ruminantes domésticos.** Arq. Inst. Biológico, São Paulo, v. 79, nº3, p. 443 – 452, jul/ set,2012.

SILVA, N. M. **Estudos sobre a paratuberculose. II. Isolamento da amostra de *Mycobacterium paratuberculosis* em meio de Hohn.** Arquivos do Instituto Biológico Animal, v. 4, p. 175-178, 1961.

SILVA, E. B. **Diagnóstico de paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil.** 2005. Pará. 60p. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Pará, Castanhal, 2005.

SIVAKUMAR P., TRIPATHI B.N. & SINGH N. 2005. **Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymphnode tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture.** Vet. Microbiol. 108:263-270.

SIVAKUMAR P., TRIPATHI B.N., SINGH N. & SHARMA A.K. 2006. **Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*).** Vet. Pathol. 43:455-462.

SLANA, I. et al. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 250-257, 2008.

STABEL, J. R. **Johne's: a hidden threat.** *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 283-288, 1998.

STABEL, J. R. Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control.** Cambridge: CAB International, 2010. cap. 21.

THOREL, M.F. **Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent /mycobacteria.** In: **Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination.** In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 3.** Orlando. Proceedings... Orlando: International Association for Paratuberculosis, p. 222–235. 1991.

TIMMS, V. J. et al. Review. **How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection?** *Journal of Microbiological Methods*, v. 85, p. 1-8. 2011.

TWORT, F.; INGRAM, G. L. Y. **A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, *Johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritidis of bovines.** *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 84, p. 517-543, 1912.

VASCONCELOS, A. T. C. de. **Búfalos no Maranhão – O búfalo do Maranhão: Interpretação Histórica.** 1ª edição. São Luis 2012. 160 p. (41 a 78).

YAMASAKI E.M., BRITO M.F., MOTA R.A., MCINTOSH D. & TOKARNIA C.H. 2013. **Paratuberculose em ruminantes no Brasil.** *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):127- 140.

YAMASAKI E.M., TOKARNIA C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. **Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro.** *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-9.

WHITLOCK, R.H; et al. **ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method.** *Veterinary Microbiology*, v.77, p.387-398, 2000.

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J. **Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis.** New Zealand Veterinary Journal, v. 54, p. 237–241, 2006.