



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

Carolina Rodrigues Torres da Costa

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ATRAVÉS DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) EM BÚFALOS ABATIDOS EM MATADOUROS NA BAIXADA MARANHENSE.**

São Luís – MA

2016

Carolina Rodrigues Torres da Costa

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ATRAVÉS DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) EM BÚFALOS ABATIDOS EM MATADOUROS NA BAIXADA MARANHENSE.**

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

Orientador:

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira

Co-orientador:

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

Co-orientador:

Emerson Antônio Araújo de Oliveira

São Luís – MA

2016

Costa, Carolina Rodrigues Torres da.

Identificação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* através de reação de polimerase em cadeia (PCR) em búfalos abatidos em matadouros na Baixada Maranhense / Carolina Rodrigues Torres da Costa. – São Luís, 2016.

60 f

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

Orientador: Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira.

1.Paratuberculose. 2.Búfalos. 3.QRT - PCR. I.Título

CDU: 636.293.2:616.9(812.1)

Carolina Rodrigues Torres da Costa

Aprovada em:     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

Pós Doutor em Ciência Animal  
Universidade Estadual do Maranhão

---

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

Doutor em Ciência Animal  
Universidade Estadual do Maranhão

---

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

Mestre em Ciência Animal  
Universidade Estadual do Maranhão

São Luís – MA

2016

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender e nem tão pequeno que não possa ensinar”*

Eposo

Ao meu avô,  
Alcindo Torres da Costa (*in memoriam*),  
que mesmo sem saber, foi o que mais  
me incentivou a seguir nesse sonho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, e principalmente por sempre estar ao meu lado, dando-me força, saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Rosemeire e Antônio Carlos, por me colocarem no mundo, me criar, educar e ensinar valores essenciais para a vida, e determinar meu caráter. A vocês dedico todas as minhas vitórias e conquistas obtidas até hoje e meu infinito amor.

A minha irmã Fernanda, pelo amor, carinho, paciência e por estar comigo uma vida inteira, e por não me permitir fraquejar nos momentos difíceis, amo você e muito obrigada.

Ao meu irmão Jhonatan, que Deus me deu, um amigo irmão que sempre me incentivou e me proporcionou amor e momentos felizes. Amo você e meu muito obrigado.

Ao meu amigo e companheiro Diego, pela paciência, carinho, compreensão, incentivo, cumplicidade e amor em todos os momentos, á você meu amor incondicional e gratidão.

A todos meus familiares por contribuírem de forma direta ou indireta na minha formação. Á vocês meu amor.

Aos professores Dr. Helder e Dr. Hamilton pela orientação, amizade, pelos puxões de orelhas sempre que necessário, por compartilhar comigo conhecimentos fundamentais para minha formação profissional e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e dedicação; minha infinita gratidão e carinho, sem vocês nada disso seria possível e realizado e me atrevo dizer, que se hoje sou assim é graças á vocês.

Ao meu amigo Emerson, por me orientar durante toda a pesquisa, ensinamentos durante toda a graduação e por me acolher no GEPRD , e por toda a amizade. Meu muito obrigado.

Aos meus amigos Taynan, Thais e Pablo, pela paciência, ensinamentos, e por compartilhar comigo todas as etapas da minha pesquisa e formação acadêmica. Á vocês o meu muito obrigado, amor, cumplicidade e amizade. Sem vocês não conseguiria.

As minhas amigas Izabelly, Julie, Thais Lara e David pela amizade durante nossa graduação e amor a mim proporcionado, amo e dedico minha amizade á vocês. Meu muito obrigado.

E não menos importante, a minha grande amiga Glenda Barros, que mesmo à distância se fez presente em minha vida, soube me acalmar, conversar, me ouvir, aconselhar, e que dava um jeitinho para tudo, pelo exemplo de profissional e pessoa. Muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos Rodrigo Fucuta, Leandro, Luara, Raissa Brandão, Emanuella que a Veterinária me deu para a vida toda (meus presentinhos de Deus), e todos meus amigos da turma 77, obrigada pela boa convivência, amizade e carinho a mim dedicado.

Ao Grupo de Estudo e Pesquisa com Ruminantes Domésticos e Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas (LDDI), pelo acolhimento e carinho, por fazer parte da minha formação acadêmica e me ensinar muito em todos os sentidos. Meu muito obrigado a toda equipe.

À Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade de estudos e por minha formação acadêmica.

Enfim, a todos que caminharam junto comigo para mais uma conquista em minha vida.

## RESUMO

A paratuberculose é uma doença infectocontagiosa, cosmopolita, incurável que atinge principalmente ruminantes domésticos, provocando uma enterite granulomatosa crônica, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). É responsável por redução da produtividade e conseqüentemente grande impacto na economia da bubalinocultura do Maranhão. O presente estudo teve como objetivo identificar o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em bubalinos abatidos em matadouros sem inspeção, na região da Baixada Maranhense, bem como também caracterizar lesões macroscópicas de tecidos de linfonodos mesentéricos, intestinos delgado e grosso de búfalos com paratuberculose subclínica. Foram coletadas amostras de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e grosso de 115 búfalos sendo 66 fêmeas e 49 machos. Realizou-se análise macroscópica dos fragmentos dos órgãos no momento da coleta quanto: espessamento da mucosa intestinal e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos. As amostras positivas na bacterioscopia foram submetidas à técnica de qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real). De 26 amostras positivas na bacterioscopia, 57,7% (15/26) foram confirmadas por meio do diagnóstico molecular. Com base nos resultados pode-se concluir que: a avaliação macroscópica identificou lesões sugestivas de paratuberculose sub clínica, o que foi confirmado a presença do MAP no diagnóstico molecular.

**Palavras-chave:** paratuberculose, búfalos, qRT-PCR.

## ABSTRACT

Paratuberculosis is a contagious disease, cosmopolitan, incurable that primarily affects domestic ruminants, causing a chronic granulomatous enteritis caused by the etiologic agent *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). It is responsible for reduced productivity and consequently large impact on the economy of buffalo of the Maranhão. This study aimed to identify *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) in buffalo slaughtered in slaughterhouses without inspection, in the Baixada Maranhense region and also characterize macroscopic lesions of mesenteric lymph node tissue, small and large intestine of buffalo with subclinical paratuberculosis. Samples of mesenteric lymph nodes were collected, small and large intestine of 115 buffalos being 66 females and 49 males. Macroscopic analysis of the fragments of organs was performed at the time of collection in accordance with: thickening of the intestinal mucosa and increased volume of mesenteric lymph node. Positive samples in bacterioscopy were submitted to qRT-PCR (quantitative real time PCR). From 26 positive samples in bacterial meningitis, 57.7% (15/26) were confirmed by molecular diagnosis. Based on the results it can be concluded that: a macroscopic evaluation identified lesions suggestive of subclinical paratuberculosis, which confirmed the presence of MAP in molecular diagnostics.

**Keywords:** Paratuberculosis, Buffalo, qRT-PCR.

## LISTA DE TABELAS

<b>Figura 1.</b> Mapa do Maranhão evidenciando a Baixada Maranhense e os municípios que a compõe.	34
<b>Figura 2.</b> Fotografia dos vasos linfáticos subserosos de intestino delgado evidentes, esbranquiçados e tortuosos (aspecto varicoso). Búfalo 24 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	37
<b>Figura 3.</b> Fotografia da cadeia de linfonodo mesentérico com aumento de tamanho e volume. Búfalo 17 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	38
<b>Figura 4.</b> Fotografia de linfonodo mesentérico protraído ao corte, com região medular escura e cortical com áreas claras com acúmulo de líquido esbranquiçado leitoso. Búfalo 20 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	38
<b>Figura 5.</b> Fotografia de linfonodo mesentérico com região cortical marro e medular enegrecida com acúmulo de material sanguinolento. Búfalo 10 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	38
<b>Figura 6.</b> Fotografia da parede do intestino delgado dilatada e espessada, com aspectos cerebróide. Búfalo 20 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	39
<b>Figura 7.</b> Fotografia da parede do intestino delgado espessada e enrugada, com aspecto cerebroide (seta). Búfalo 20 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	40
<b>Figura 8.</b> Fotografia da mucosa duodenal espessada, com aspecto enrugado. Búfalo 10 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	40
<b>Figura 9.</b> Fotografia com evidente espessamento e pregueamento da mucosa duodenal com presença de conteúdo líquido amarronzado (seta). Búfalo 10 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015	41
<b>Figura 10.</b> Fotografia da mucosa espessada e pregueada com áreas hiperêmicas (setas), observa-se conteúdo líquido amarronzado. Búfalo 20 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	41
<b>Figura 11.</b> Fotografia da mucosa espessada e pregueada com cor marrom-escuro. Búfalo 24 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	42
<b>Figura 12.</b> Fotografia da mucosa espessada e pregueada, áreas com múltiplas petéquias hemorrágicas e presença de líquido semilíquido amarronzado. Búfalo 24 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.	42
<b>Figura 13.</b> Fotografia da válvula íleo-cecal aumentada de volume e edemaciada. Búfalo 24 com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015	43
<b>Figura 14.</b> Fotografia da mucosa dilatada, espessada, edemaciada com líquido verde-oliva (A) Búfalo 25; Ceco com mucosa dilatada e pregueada com áreas irregulares avermelhadas (B) Búfalo 22, com paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015	44
<b>Figura 15.</b> Fotografia de pregueamento com áreas avermelhadas na mucosa enrugada. Notou-se líquido verde-oliva. Búfalo 10, com paratuberculose subclínica, Baixada	44

Maranhense, MA, 2015.

**Figura 16.** Mapa do Maranhão evidenciando a Baixada Maranhense e os municípios que a compõe.

## LISTA DE SIGLAS

**AGED** - Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

**BAAR** - Bacilo álcool-ácido resistente

**FAPEMA** – Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio ambiente

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**LABAD** – Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos

**LDDI** - Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas

**MAP** - *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*

**qRT-PCR** - PCR Quantitativo em Tempo Real

**UEMA** – Universidade Estadual do Maranhão

**UFRPE** – Universidade Federal Rural de Pernambuco

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 BAIXADA MARANHENSE	18
3.2 BUBALINOCULTURA	18
3.3 BUBALINOCULTURA NA BAIXADA MARANHENSE	19
3.4 PARATUBERCULOSE	19
3.4.1 HISTÓRICO DA PARATUBERCULOSE	19
3.4.2 PARATUBERCULOSE NO BRASIL	21
3.4.3 ESTIOLOGIA	24
3.4.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	25
3.4.5 PATOGENIA	27
3.4.6 SINAIS CLÍNICOS	28
3.4.7 PATOLOGIA	29
3.4.8 DIAGNÓSTICO	30
3.4.9 ACHADOS DE NECROPSIA	31
3.4.10 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL(qRT-PCR)	31
3.4.11 TRATAMENTO	32
3.4.12 CONTROLE	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 ÁREA DE ESTUDO	35
4.2 AMOSTRAGEM	36
4.3 COLETA DE FRAGMENTOS DE TECIDO	36
4.4 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICAS DA LESÃO	36
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	36
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS	38
5.1.1 VASOS LINFÁTICOS	38
5.1.2 LINFONODOS	39
5.1.3 INTESTINO DELGADO	40
5.1.4 INTESTINO GROSSO	44
5.2 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	47
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	51

## 1 INTRODUÇÃO

A bubalinocultura brasileira vem apresentando elevado crescimento nas últimas décadas, evidenciado pelo aumento populacional desses animais em diversas propriedades e regiões, tanto na produção de leite e abate quanto na comercialização de matrizes e reprodutores. Isso se dá pelo fato dos búfalos serem animais que apresentam alta rusticidade, resistência a doenças e adaptabilidade a solos, e apresentarem também a capacidade de produzir proteínas de alto valor (carne e leite) a partir alimentos fibrosos (RODRIGUES et al., 2008).

Segundo dados da Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão, o estado encontra-se em um lugar de destaque nacional, em relação à bubalinocultura, sendo considerado o 3º maior rebanho do Brasil e o 1º lugar na região Nordeste, com cerca de 80 mil cabeças de búfalos no estado, por conseguinte, mais de 18.589 cabeças se encontram em Viana, município com maior rebanho do estado maranhense (AGED, 2010).

O estado tem particularidades que favorece a criação de búfalos, principalmente na Baixada Ocidental Maranhense: clima propício, abundância de água e um solo que favorece pasto de qualidade. Em 27 municípios dessas duas regiões, concentra-se a maioria do rebanho bubalino do estado com destaque para Viana, Penalva e Cajari que reúne cerca de 70 a 90% dos Búfalos do Maranhão (BERNARDI, 2005).

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 73,75% do efetivo bubalino do Estado (IBGE, 2014).

Os búfalos vieram para a Baixada Maranhense, principalmente da Ilha de Marajó, onde encontraram nas lagoas de água doce no período de estiagem e no campo alagado no período chuvoso, além da semelhança da vegetação se assemelhar a encontrada naquela Ilha da qual procediam, lugares ideais para a criação animal.

A baixa sanidade desses rebanhos é ocasionada pela falta de manejo adequado, a partir disso diversos fatores negativos ocorrem, um deles, é quando os animais são acometidos por enfermidades. Dentre elas podemos destacar a paratuberculose. Esta enfermidade ou doença de Johne é uma enterite granulomatosa, crônica, infecciosa e que afeta ruminantes domésticos e silvestres (CHIODINI et al., 1984; KREEGER, 1991), cujo agente etiológico é

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Trata-se de uma enfermidade incurável, cosmopolita e de distribuição mundial.

A enfermidade é responsável por perdas econômicas que ocorrem pela redução na produtividade, maior susceptibilidade a outras doenças, aumento dos custos sanitários e maior taxa de descarte precoce (HUTCHINSON, 1996).

Casos de paratuberculose em Bubalinos foram relatadas por Mota et al. (2010) no Pernambuco. No Brasil as pesquisas sobre a doença ainda estão evoluindo e o seu impacto econômico ainda não foi mensurado (GOMES et al., 2002).

A espécie bubalina, apesar de ser considerada uma espécie menos susceptível à infecção pelo MAP em relação aos em bovinos (SIVAKUMAR et al., 2006), foram relatados, até o momento, casos clínicos de paratuberculose em duas regiões do país, sendo o primeiro caso descrito na região Nordeste, Estado de Pernambuco por Mota et al. (2010), em seguida por Reis et al. (2015) no estado de Maranhão.

A transmissão de *M. paratuberculosis* pode ocorrer por via intra-uterina, no período pós-natal através do colostro e, principalmente, pelas fezes de animais contaminados (SWEENEY, 1996). Bovinos que desenvolvem a doença clínica, em geral são aqueles infectados nas primeiras semanas de vida. A doença clínica manifesta-se geralmente em animais com idade superior a 2 anos (RADOSTITS et al., 2006; SWEENEY, 1996).

Fatores estressantes, tais como, parto e má nutrição, podem desencadear o aparecimento dos sinais clínicos (KREEGER, 1991; WHITLOCK & BUERGELT, 1996). A doença é mais frequente em bovinos confinados em função da maior contaminação do ambiente pelas fezes (RADOSTITS et al., 2006).

Os testes diagnósticos preferencialmente utilizados para diagnosticar a paratuberculose, podem ser divididos em duas: 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 e exame histológico de tecidos-alvo para detecção do bacilo álcool-ácido resistente. Entre os testes para detecção de anticorpos específicos, o teste de ELISA é o mais amplamente utilizado (BUERGELT & GINN, 2000).

Para diagnosticar essa infecção, um dos métodos utilizados é a qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real) que consiste em uma técnica de amplificação extremamente

sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contanto que no mesmo a bactéria esteja presente (ALBERTS et al., 1997).

Atualmente, testes baseados na qRT-PCR têm sido ferramentas importantes na identificação de elementos genéticos, além de aumentar consideravelmente a sensibilidade dos testes para detecção de animais com a infecção subclínica (CASTELLANOS et al., 2010; TIMMS et al., 2011; LOGAR et al., 2012). No Brasil, a partir de 2005, iniciaram-se estudos moleculares com a utilização da qRT-PCR para detecção de alguns fragmentos genéticos de MAP, o IS900, F57 e ISMav2 em búfalos (MOTA et al. 2010, DALTO et al., 2012).

Devido à importância socioeconômica dessa enfermidade nos rebanhos bubalinos da baixada maranhense e a falta de estudos científicos relacionados a esta enfermidade, é que se propôs a realização desta pesquisa, tendo como foco principal detectar a presença do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras provenientes da região da Baixada Maranhense através da técnica de qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- ✓ Identificar o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em bubalinos abatidos em matadouros, na região da Baixada Maranhense.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- ✓ Detectar o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em amostras de tecidos de búfalos, com o uso da técnica qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real);
- ✓ Caracterizar lesões macroscópicas de tecidos de linfonodos mesentéricos, intestinos delgado e grosso de búfalos com Paratuberculose subclínica.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BAIXADA MARANHENSE

A Microrregião da Baixada Maranhense abrange 23 municípios e está localizada na região continental de oeste a sudeste da Baía de São Marcos. Atualmente possui uma área de 1.775.035,9 ha, que se estendem por 20 mil quilômetros quadrados nos baixos cursos dos rios Pericumã e Aura. Sua característica principal é a ocorrência de terras baixas, planas, inundáveis, “caracterizada por campo, mata de galeria, manguezais e bacias lacustres, foi incluída como sítio Ramsar devido ao alagamento de suas terras baixas, restando apenas terras firmes onde a presença de aves é abundante” (GRANZIERA, 2009).

A região fica seis meses seca e seis meses alagadas. Na estação chuvosa, os rios e lagos transbordam deixando os campos inundados. Estes são transformados em extensos lagos rasos, onde se desenvolve essencialmente a pecuária bubalina e a pesca artesanal. Parte das águas é devolvida aos rios quando seus níveis baixam (MUNIZ, 2007).

A vegetação da Baixada é rica e variada, com a existência de 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. Estão presente na região uma rica fauna e flora aquática e terrestre, com diversas espécies raras (MUNIZ, 2007).

#### 3.2 BUBALINOCULTURA

Introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, usualmente em pequenos lotes originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe, motivados muito mais pelo seu exotismo que por suas qualidades zootécnicas. Sua grande adaptabilidade aos mais variados ambientes, sua elevada fertilidade e longevidade produtiva, porém, 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, com um crescimento anual médio de 10,86% entre 1961 e 1980, destacando-se que, no mesmo período, o rebanho bovino cresceu a taxas de 3,8% ao ano (GARCIA et al., 2005).

Os búfalos domésticos pertencem à família *Bovidae*, a subfamília *Bovinae* e a espécie *Bubalus bubalis*. Estes podem ser classificados como do tipo de habitat em rios e em pântanos. Os de rio são de coloração preta e possuem 50 pares de cromossomos e os de pântano possuem coloração mais clara e 48 pares de cromossomos (DAMÉ, 2006).

A bubalinocultura brasileira vem apresentando elevado crescimento nas últimas décadas, evidenciado pelo aumento populacional desses animais em diversas propriedades e regiões, tanto na produção de leite e abate quanto na comercialização de matrizes e reprodutores. Isso se dá pelo fato dos búfalos serem animais que apresentam alta rusticidade, resistência a doenças e adaptabilidade a solos, e apresentarem também a capacidade de produzir proteínas de alto valor (carne e leite) a partir alimentos fibrosos (RODRIGUES et al., 2008).

A bovinocultura brasileira tem passado por alterações na legislação sanitária com a imposição de normas mais rígidas de qualidade de produto, além de maior exigência por parte das indústrias, afastando drasticamente, os pequenos produtores dessa atividade. De forma inversa, a bubalinocultura tem crescido nas regiões onde existem laticínios de captação de leite desses animais e cada vez mais, produtores passam a explorar essa atividade, obtendo retorno econômico superior ao que obtinham na bovinocultura, pois seus produtos são mais bem remunerados e há menor necessidade de reposição, visto a maior longevidade desses animais (BERNARDES, 2007).

### **3.3 BUBALINOCULTURA NA BAIXADA MARANHENSE**

O rebanho bubalino foi introduzido no Maranhão em 1930, contudo sua maior difusão ocorreu a partir de 1960 na Baixada Maranhense, por incentivos dos governos estadual e federal, no intuito de promover um amplo desenvolvimento econômico na área (IBAMA, 1989). Essa criação de búfalos atingiu no início dos anos de 1990 um rebanho superior a 120.000 cabeças (IBGE, 2015).

A Baixada Maranhense tornou-se o ambiente ideal para criação bubalina, devido os seus campos serem utilizados para produção extensiva de búfalos, por serem alagados e assim ser de grande adaptabilidade para esses animais, fazendo com que se expandissem de forma rápida; estes foram trazidos principalmente da ilha de Marajó para o Maranhão sob a justificativa de que a expansão do setor de criação de gado, tanto bubalino como bovino, contribuiriam com a riqueza e o desenvolvimento da região (BERNARDI, 2005).

### **3.4 PARATUBERCULOSE**

#### **3.4.1 HISTÓRICO PARATUBERCULOSE**

A paratuberculose foi descrita pela primeira vez na Alemanha, em 1895, por Johne e Frothingam como uma forma atípica da tuberculose em uma vaca com seis anos de idade, que

apresentava perda de peso e diarreia crônica. À necropsia, os autores observaram enterite sem lesões compatíveis com tuberculose intestinal, apesar de a histopatologia revelar infiltração granulomatosa e bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR's). (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 também denominada de doença de Johne. (JOHNE & FROTHIGAM, 1895).

O isolamento do microrganismo foi realizado por Twort em 1910, observando o agente da paratuberculose em tubos de inoculados e, pela inspeção apurada dos tubos inoculados que resultou na constatação do crescimento de colônias satélites, crescendo em culturas contaminadas com bacilo do feno, o *Mycobacterium pheli*. Posteriormente conseguiu isolar um novo BAAR's que denominou de *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne* (TWORT & INGRAM, 1912).

Nos anos subseqüentes, houve um desenvolvimento de inúmeras pesquisas sobre a paratuberculose no mundo inteiro, com um acúmulo considerável de conhecimento a respeito da avaliação de teste de diagnósticos, no cultivo do agente e, na descrição da doença clínica. Nos anos 20, a Doença de Johne era descrita na África e na Ásia e tendo início na França, os primeiros estudos por Valleé e Ringjard com a inoculação desse agente em animais e, no desenvolvimento de vacinas (VALLEÉ & RINGJARD, 1926).

Nos anos 30 a paratuberculose foi descrita pela primeira vez na América do Sul e Índia, comprovando que a doença possui uma grande capacidade de disseminação nos rebanhos mundiais, tornando-se uma ameaça direta ao desenvolvimento da atividade pecuária, devido a sua grande resistência idade-independente (CHIODINI, 1993).

Nas décadas de 50 e 60 foram criadas medidas de controle da doença com números experimentos em vacinação e, ensaios de diagnósticos tais como, migração de leucócitos e teste de imunofluorescência, com a finalidade de investigar e identificar a participação dos animais subclínicamente infectados (carreadores) na cadeia de transmissão e manutenção do *M. avium* subs. *paratuberculosis* dentro do rebanho. Nesse período, foram evidenciados os mecanismos patogênicos, virulência, além da infecção intra e trans-uterina pelo isolamento do agente no útero e sêmen (CHIODINI, 1993).

Segundo Chiodini (1993) o somatório dos estudos realizados no mundo inteiro, ao longo dessas décadas, resultou em avanços de suma importância para a compressão da

patogenia, patologia, bacteriologia, imunologia, epidemiologia, tratamento e medidas profiláticas de controle da paratuberculose assim como para o conhecimento da biologia, fisiologia e estrutura antigênica do *M. avium* subs. *paratuberculosis* (CHIODINI, 1993).

### 3.4.2 PARATUBERCULOSE NO BRASIL

O primeiro registro da enfermidade no Brasil foi realizado por Otávio Dupont (1915), em animais da raça Flamengo importados da Bélgica para o Estado do Rio de Janeiro, no então Posto Zootécnico Federal em Pinheiro, e divulgado através da publicação de uma nota no Jornal do Comércio do Rio de Janeiro em 05/11/1915 (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. Estes fatos sugerem fortemente que a enfermidade era exótica e foi introduzida no país através de animais importados.

Em 1960, Dacorso Filho et al., 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. Silva e Pizelli (1961) observaram a paratuberculose em um bovino nacional da raça Jersey, pertencente a uma propriedade situada no município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro.

No mesmo ano, Silva (1961) isolou, pela primeira vez no Brasil, o *Mycobacterium paratuberculosis*, a partir de suspensões de gânglios linfáticos mesentéricos de bovino. O isolamento foi feito em meio de cultura Hohn. Também no mesmo ano, Silva (1961) isolou a micobactéria em ovos de galinha embrionados, a partir da suspensão do mesmo material e constatou a susceptibilidade da espécie à infecção.

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

Posteriormente, Portugal et al. (1979) relataram dois casos da doença em bovinos no Estado de Santa Catarina, primeiro em um touro da raça Normanda nacional, de cinco anos de idade, no município de Brusque, e o segundo caso, em uma fêmea Holandesa importada da Holanda em Florianópolis.

Outro caso clínico da enfermidade foi descrito no Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1986), o diagnóstico foi comprovado em um touro da raça holandesa, doador de sêmem em central de inseminação artificial, pelo isolamento do agente. Em Minas Gerais, Nakajima et al. (1991) relatou a enfermidade em uma vaca holandesa com cinco anos de idade, importada dos EUA.

Poester e Ramos, em 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.

Em 1996, Riveira observou através da sorologia, a presença da enfermidade em cinco propriedades no Mato Grosso do Sul e estimou que havia 45,5% de animais reagentes ao teste ELISA. Já no Estado de São Paulo estimou, o mesmo autor, 65% de soropositivos.

Em 1999, Driemeier et al. descreveram oito casos clínicos de paratuberculose no município de Capela de Santana, Estado do Rio Grande do Sul, com histórico de importação de vacas 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 et al. (2001), detectou anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em 45 propriedades localizadas em diversos municípios do estado, através do teste ELISA. Foram encontrados 18% de animais reativos distribuídos em 82% das propriedades.

Em 2002, Gomes et al. 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. Estimaram a infecção em 39,8% dos bovinos testados pelo ELISA indireto.

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. (2001) relataram a ocorrência de paratuberculose em rebanho bovino, no município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. O diagnóstico foi baseado nos testes ELISA, cultivo bacteriano e histopatologia.

Em 2005, Silva 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.

Em 2008, Oliveira et al., 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.

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

Em 2010, observou-se 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). Em seguida, 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.

Reis 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

A paratuberculose ou enterite paratuberculosa, conhecida também doença de Jonhe como é causada pelo MAP. Antes conhecido apenas como *Mycobacterium paratuberculosis*, a Associação Internacional de Paratuberculose propôs sua reclassificação como subespécie do *M. avium* passando a ser chamado mundialmente como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MANNING & COLLINS, 2003).

Quanto ao crescimento, suas colônias aparecem entre quatro a 12 semanas, levando assim, meses desde o cultivo até a sua identificação (CARTER, 1988). Seu meio de cultura necessita da incorporação, de um fator de crescimento, chamado micobactina, derivado de uma micobactéria patogênica, a *Mycobacterium phlei* (CARTER, 1988; MANUAL MERCK, 1997).

Isto torna uma característica importante para a sua identificação, pois, muitas micobactérias são capazes de produzir por si mesmas a micobactina, porém, o MAP não possui esta capacidade, necessitando deste fator para crescer em laboratório (MANUAL, 1996). O MAP é um microrganismo aeróbico que se apresenta na forma curta, grossa e não esporulada (CARTER, 1988). Com o tamanho variando entre 0,3 a 2 µm de largura (SEFFNER, 1988).

É um bastonete intracelular ácido-resistente, encontrado em aglomerados no interior de macrófagos, na lâmina própria intestinal, e nas fezes de ruminantes infectados (STEHMAN, 1993), sendo esta mais uma de suas características para observação em microscópio, pois este agente é encontrado em grupos de três ou mais organismos (MANUAL, 1996). Quanto a sua sobrevivência, estudos demonstraram uma maior sobrevivência em solo úmido ou alagado comparado com o solo seco exposto a temperaturas elevadas (SCHOROEN et al., 2002).

Nas águas fluviais e em poças d'água, é relatado um período de cinco ou nove meses (CHIODINI et al., 1986). Na água esterilizada sobrevive por mais de nove meses (Silva, 1990). Nas fezes e no solo aproximadamente um ano (CHIODINI et al., 1986; MANUAL MERCK, 1997). A sobrevivência é inibida pela exposição à luz do sol, calor, urina, e pelo processo de ensilagem (STEHMAN, 1993).

A resistência aos ácidos e aos álcalis é tomada como uma de suas características de

classificação: bacilo álcool-ácido resistente. Possui resistência ainda ao cloranfenicol e à penicilina, a qual é adicionada aos meios de cultura a fim de evitar crescimento de outros agentes. É destruído pelos cresóis a 5% em duas horas, pela formalina e o lisol a 5% em 10 minutos (MANUAL MERCK, 1997).

#### **3.4.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

O bovino é a espécie mais acometida pela doença, entretanto já foi descrita em ovinos, caprinos, ruminantes silvestres, suínos, coelhos, raposas e recentemente foi relatada em equinos. 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 dois e cinco anos de idade. (OIE, 2012).

Os bovinos infectados, normalmente são aqueles que entraram em contato com o Map nas primeiras semanas de vida (TAYLOR, 1953); alguns deles desenvolvem a enfermidade e outros, em sua maioria, permanecem assistemáticos, eliminam o agente dentro do rebanho.

O contágio entre animais faz-se principalmente pela contaminação oro-fecal em 80% dos casos. A infecção nos animais jovens ocorre, no momento da amamentação, através do contato com tetas contaminadas com as fezes, pela ingestão de colostro ou leite de vacas infectadas, além disso, não possuem seu sistema imunológico completamente desenvolvido, aumentando os riscos de infecção (MOMOTANI et al., 1988).

Alguns 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).

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).

O ferro é um elemento essencial para a maioria das bactérias, sua disponibilidade e sequestro estão associados com a virulência e sobrevivência bacteriana. Bactérias e fungos

produzem receptores de membrana específicos para o transporte do ferro, e excretam sideróforos, complexos solúveis de ferro, que são captados por receptores de membrana da bactéria e, posteriormente liberados na célula por hidrólise do quelador (BARCLAY, 1985 apud JOHNSON-IFEARULUNDU et al., 1997).

A maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* spp produz dois sideróforos: micobactina e exoquelina (SNOW, 1970; FISS et al., 1994; GOMES, 2002). O Map não produz micobactina o que o torna incapaz de sequestrar o ferro fora do hospedeiro; esta dependência foi comprovada “in vitro” através da adição de concentrações elevadas de ferro ou suplementação com micobactina ao meio de cultura. A dependência à micobactina não é exclusiva do Map, outras espécies tais como *M. avium* subsp. *silvaticum* e outras cepas de *M. avium* também apresentam esta característica (COCITO et al., 1994). Lambrecht e Collins (1992) demonstraram que a alteração do pH do meio e a concentração de ferro influenciaram o crescimento do Map na ausência de micobactina, e relataram crescimento ótimo em pH entre 5,5 e 6,0. A dependência à micobactina pode ser substituída pela ação de altas concentrações de ferro no meio artificial de cultivo (COCITO et al., 1994).

As altas taxas de concentração de lactoferrina e transferrina presentes no colostro ingerido pelos bezerros (MOMOTANI et al., 1988), promovem uma ação antimicrobiana, no entanto, aumentam a sobrevivência do Map, em decorrência da formação de complexos moleculares com o ferro utilizado pela micobactéria para a produção de micobactina, tanto pelo Map (MOMOTANI et al., 1988) como por outras bactérias, tais como, coliformes, salmonelas e pseudomonas.

Anticorpos maternos liberado no leite podem agir como opsoninas, e auxiliam na penetração da micobactéria nas células M e enterócitos (MOMOTANI et al., 1988).

Outras condições como carga de microrganismos, idade, estresse, doenças imunossupressoras e período pós-parto são consideradas fatores desencadeantes do processo e influenciam na susceptibilidade dos animais à infecção (STABEL, 1998).

Um fator 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).

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).

A transmissão ocorre com mais frequência em animais que permanecem em confinamento e esta pode ser uma das razões para a maior prevalência da doença ser em rebanhos leiteiros se compararem com os de corte (MERKAL et al, 1984).

A ocorrência da doença raramente é maior do que 5% em animais adultos e a mortalidade é menor que 1% ao ano. Estima-se que em um rebanho, para cada caso clínico de paratuberculose existam entre 15 a 25 animais subclínicos (SWEENEY, 1996).

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 considerada um aspecto epidemiológico importante, (GOMES et al., 2002; MOTA et al., 2007).

Estudos realizados no Brasil com bezerros de rebanhos bubalinos criados no sistema de aleitamento natural, diretamente do úbere, onde vários bezerros mamavam coletivamente nas fêmeas lactantes, relataram que esta condição pode favorecer os índices de animais soropositivos nas propriedades (DALTO et al., 2012).

Uma ferramenta valiosa em investigações epidemiológicas é a identificação de diferentes cepas de microrganismos (KAUR et al., 2011), possibilitando determinar, por exemplo, a fonte de infecção, os fatores de risco que influenciam na transmissão do patógeno, se a infecção é resultado da introdução de um animal proveniente de outro rebanho ou se está associada ao contato com o ambiente contaminado da propriedade. Isto facilita a avaliação de programas de controle regionais e adoção de medidas sanitárias estratégicas, direcionado para cada rebanho (MOTIWALA et al., 2006).

### **3.4.5 PATOGENIA**

Após a ingestão de alimentos ou água contaminada com o MAP, estes vão localizar-se na mucosa do intestino delgado, em sua porção final, predominantemente na região ileocecal, e nos linfonodos associados (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Ao chegarem no lúmen intestinal, os MAPs são capturados pelas células M que revestem as placas de Peyer, lá porém, não chegam a ser digeridos, por possuírem em sua camada externa um elevado conteúdo de lipídios (STEHMAN, 1993), há multiplicação da micobactéria, causando um aumento de volume celular e deslocamento de seus núcleos para

os pólos, dispendo os macrófagos em associações ou acúmulos celulares, tomando caráter de célula epitelióide. Há então, morte dos macrófagos e liberação das bactérias, que novamente são fagocitadas, provocando acúmulos de macrófagos carregados de bactérias nas vilosidades e posteriormente nas camadas profundas da lâmina própria. Assim como, aumento de volume das vilosidades. As glândulas da lâmina própria desagregam-se e, são em parte destruídas por atrofia (SEFFNER, 1988).

A ruptura da arquitetura mucosa normal e dos linfáticos associados pelos macrófagos, linfócitos e monócitos recrutados provoca a distorção das vilosidades e criptas. A atrofia da vilosidade conduz a má absorção das proteínas (STEHMAN, 1993).

Em consequência ao escoamento persistente da proteína no lúmen do jejuno, observa-se fraqueza muscular, hipoproteinemia e edema, com a membrana mucosa tornando-se enrugada e engrossada devido às células epitelióides e gigantes, contendo vários microrganismos que podem ser eliminados com as fezes (CARTER, 1988).

Há excessiva produção local de IgG na mucosa intestinal, formando complexos imunes, que possuem atividade quimiotáxica direcionada para os macrófagos, podendo provocar a degranulação dos mastócitos, e liberação de histamina, o que resulta na inflamação e vasodilatação local, implicando na patogênese da diarreia, na paratuberculose (STEHMAN, 1993).

Os microrganismos não produzem toxina, agem como corpo estranho e estimulam a formação de células conjuntivas, e as lesões se apresentam com acúmulo de células epitelióides, de células gigantes, linfócitos e polinucleares. Não há necrose, nem formação de tubérculos (CARTER, 1988).

Dependendo da resistência do animal, a infecção é eliminada ou o animal permanece infectado como um portador sã. Os portadores sub-clínicos excretam um número variável de MAP nas fezes (MANUAL, 1996).

### **3.4.6 SINAIS CLÍNICOS**

Sobre a primeira observação de Paratuberculose no Brasil, em um touro da raça Holandesa, com seis anos de idade, importado da Holanda, foram detectados os seguintes sinais clínicos: diarreia intermitente e fétida, severa emaciação, caquexia e ausência de febre (SANTOS & SILVA, 1956).

Diarreia persistente, irresponsiva ao tratamento, rápida perda de peso, apetite normal e ausência de febre são sinais típicos da Paratuberculose bovina. A diarreia, apesar de crônica,

alterna com algumas fases de melhoras, em que o estado diarréico desaparece (COLLINS et al., 1999). Na doença propriamente dita, a fase clínica pode ser antecipada devido a fatores de estresse, como parto, lactação e má nutrição (CHIODINE et al., 1984).

Edema submandibular e em outras áreas também pode ser visto em casos avançados da doença. Além disso, a emaciação, com marcante perda de massa muscular, séria atrofia do depósito de gordura e fluido de efusão na cavidade 24 corporal são frequentemente observados (BARKER et al., 1993).

A anemia é detectada ocasionalmente e a pele áspera com alopecia e, algumas vezes, despigmentada podem ser vistas em casos clínicos da doença (BLOOD et al., 1991; STEHMAN, 1990) 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).

A Paratuberculose bovina subclínica está associada ao aumento dos sinais inespecíficos como diminuição da produção de leite e transtornos reprodutivos e uma maior incidência de mastites (MERKAL et al., 1975). No entanto, alguns animais não exibem uma sintomatologia clínica definida da moléstia. Esta, por sua vez, é uma característica importante na disseminação da doença (BLOOD et al., 1991).

### **3.4.7 PATOLOGIA**

Nos animais infectados acontecem mudanças imunológicas e morfológicas. Apresentam três estágios: (1) subclínico, sem eliminação do agente, (2) subclínico, com eliminação e (3) clínico e intermitente, com eliminação permanente do agente. Cada estágio associado com mudanças patológicas (BUERGELT & GINN, 2000).

As lesões macroscópicas são principalmente encontradas no intestino delgado e nos linfonodos associados (DRIEMEIER et al., 1999). O local mais comum é a parte terminal do íleo, muito embora seja comum alterações no restante do intestino delgado e grosso, assim como nos linfonodos mesentéricos (JONES et al., 2000).

A válvula íleocecal mostra-se inflamada e aumentada de tamanho 15 a 20 vezes. Os linfonodos mesentéricos afetados tornam-se hipertrofiados, edematosos, e pálidos, com fraca distinção corticomedular. Nos casos avançados há enterite granulomatosa difusa ou segmentar

que afeta o trato intestinal desde o duodeno até o reto, porém é bastante comum ser encontrada no íleo distal (STEHMAN, 1993).

Podem ocorrer ainda, mineralização da parede de artérias, com presença de placas esbranquiçadas, opacas, irregulares que se salientam na superfície interna dos grandes vasos (DRIEMEIER et al., 1999).

Classicamente, a mucosa tem aparência enrugada, apresentando um aumento na espessura da parede intestinal de três a quatro vezes a mais que o normal, ficando com o aspecto das circunvoluções cerebrais (BLOOD et al., 1983, DRIEMEIER et al., 1999). Não há ulceração ou descontinuidade na superfície da mucosa, nem nódulos, como ocorre na tuberculose (SEFFNER, 1988).

Não ocorrem lesões nos fetos infectados, mas o microrganismo pode ser isolado das vísceras, da placenta e do útero (BLOOD et al., 1983). Na microscopia as principais alterações observadas estão no intestino delgado, nos vasos linfáticos e nos linfonodos mesentéricos, apresentando enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas.

No intestino, a lesão é principalmente observada na mucosa e submucosa do jejuno e íleo com presença de infiltrado inflamatório assumindo aspecto epitelióide ou células gigantes de Langhans, contendo grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes, observados através da técnica de Ziehl-Neelsen (DRIEMEIER et al., 1999).

### **3.4.8 DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico da paratuberculose é baseado em aspectos importantes, tais como, 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, pode ser observada lesões características da doença no intestino. Além da demonstração de BAAR's em esfregaços, histologia e/ou isolamento de Map em cultivo bacteriano específico para confirmação de diagnóstico laboratorial (OIE, 2012).

A fase subclínica da infecção o diagnóstico pode ser feito através da sorologia ou do isolamento do Map em cultivo bacteriano, a partir de fezes ou tecidos coletados à necropsia. Outra metodologia utilizada é o teste do interferon-gama para demonstrar a resposta celular mediada (OLSEN et al., 2002).

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). No entanto, a ineficiência dos testes laboratoriais para detecção dos animais na fase clínica ou subclínica da doença é o principal empecilho no diagnóstico e controle da doença de Johne (SIGURDARDOTTIR, et al., 1999).

#### **3.4.9 ACHADOS DE NECROPSIA**

Na necropsia observam-se, vasos linfáticos proeminentes, esbranquiçados e com aspecto tortuoso, que pode se estender da serosa intestinal até o mesentério; é um achado macroscópico que conduz ao diagnóstico presuntivo da paratuberculose à necropsia, nos casos avançados da doença de Johne (BUERGELT et al., 1978).

Lesões mais específicas são encontradas no intestino delgado e, em casos mais graves, se prolongam desde o duodeno até o reto; caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, em que a mucosa adquire aspecto cerebroide e/ou anelado devido à formação de rugas e pregas transversais, além disso, apresenta aspecto microgranular em sua superfície (CLARKE, 1997; CHIODINI et al., 1984).

No estágio mais avançado da doença os linfonodos mesentéricos encontram-se edematosos, aumentados de tamanho e ao corte, protraí e flui grande quantidade de líquido leitoso (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; DRIEMEIER et al., 1999; YAMASAKI et al., 2010).

#### **3.4.10 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)**

A PCR é uma ferramenta de diagnóstico rápida e específica, mas ainda não sensível o suficiente para detecção de DNA em casos contendo poucos BAARs (GWOZDZ et al., 1997). A sensibilidade do teste depende da eficiência do isolamento do DNA a partir de amostras clínicas, das condições da amplificação e do método de detecção dos produtos da PCR. No entanto aproximadamente 10<sup>10</sup> cópias de fragmentos com 100pb são necessários para tornar possível a visualização das bandas no gel (ALTWEGG, 1995). Além disso, a especificidade também é questionável. Portanto, a especificidade e sensibilidade do teste PCR devem ser melhoradas através de modificações e adições de etapas nos protocolos já descritos, tais como, o real-time PCR, métodos de hibridização, determinação de produtos da PCR com enzimas de restrição, sequenciamento, PCR-ELISA e ou nested-PCR (EELES et al., 1992; POLJAK et al., 1996).

Diversos autores propuseram métodos de diagnóstico molecular em tecidos fixados em

formol e incluídos em parafina (BARCELOS et al., 2008). A técnica oferece vantagens em relação à identificação convencional através do cultivo dependente de micobactina (COUSINS et al., 1999). Mcfadden et al. (1987) identificaram o elemento de inserção denominado IS900 no genoma do Map; há de 15 a 20 cópias e seu tamanho equivale a 1451pb do qual 66% é G + C (COLLINS et al., 1999).

No entanto, Map está intimamente relacionado com organismos ambientais do complexo *M. avium*, particularmente *M. avium* subsp. *avium* o qual apresenta 97% de homologia do DNA de isolados de Map e o IS900 já foi confirmado em *Mycobacterium* sp. (ENGLUND et al., 2002; BANNANTINE et al., 2002). Nestes casos sugereutilização de enzima de restrição nas amostras positivas para confirmar se a sequencia amplificada é compatível com Map (COUSINS et al., 1999).

A PCR tem sido utilizada para detectar a presença de Map no leite “in natura” (BÖLSKE & HERTHNEK, 2010), fezes de bovinos (ALINOVI et al., 2009; BÖLSKE & HERTHNEK, 2010), sangue periférico de bovinos (KHOL et al., 2010), raspado intestinal de bovinos e búfalos (KHAN et al., 2010), sêmen de bovinos (HERTHNEK et al., 2006) e búfalos (KHOL et al., 2010) e em intestino de seres humanos com a doença de Crohn (SANDERSON et al., 1992).

As sequências de DNA denominadas ISMav2, ISMap2 e f57 são consideradas específicas para Map e não há relatos da sua ocorrência em outras micobactérias (BANNANTINE et al., 2002).

#### **3.4.11 TRATAMENTO**

Não há tratamento específico para a paratuberculose. Mesmo em animais tratados com antibióticos, a doença mostra-se refratária ao tratamento (DRIEMEIER et al., 1999). Devido as micobactérias possuírem o seu exterior complexo o que contribui para a resistência a muitos agentes antimicrobianos (MURPHY et al., 2002).

O uso de drogas antimicobacterianas ameniza os sinais clínicos e a excreção do microrganismo pelas fezes, porém não é capaz de eliminar completamente a infecção (JOHNSON-IFEARULUN et al., 1997). A utilização de medicamentos farmacológicos não se aplica ao tratamento da paratuberculose em ruminantes, mesmo que possam ser obtidas pequenas melhoras com o uso de drogas com a hidrazina ou estreptomina, além do que, na grande maioria, o custo do tratamento supera o valor estimado dos animais, tornando-se uma pratica economicamente inviável ao bolso do produtor (LARSEN et al., 1975).

### 3.4.12 CONTROLE

Mundialmente, as medidas de controle são baseadas em abate dos animais positivos (MANUAL MERCK, 1997), separação da mãe imediatamente após o nascimento dos filhotes de vacas positivas, alimentação com colostro pasteurizado ou proveniente de vacas negativas. Aquisição de animais de áreas com certificação livre da doença (STERNBERG et al., 2002). A separação dos animais adultos e jovens é importante, evitando a transmissão entre os grupos, principalmente, pela água de beber e alimentos contaminados pelas fezes (STEHMAN, 1993).

O controle da doença torna-se fragilizado, em virtude da natureza insidiosa da doença de Johne, ao lento desenvolvimento das lesões intestinais e à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos disponíveis, particularmente na população de animais infectados e assintomáticos (CHIODINI et al., 1984; NRCNA, 2003; OIE, 2012).

A maioria dos programas de controle para a paratuberculose prioriza a redução da intensidade dos sinais clínicos, pois a erradicação da infecção do rebanho parece ser uma tarefa inviável, devido em parte, à insensibilidade dos testes diagnósticos; a permanência de animais infectados no plantel atua como fonte de infecção de novos animais (HUYGEN et al., 2010).

As vacinas evitam a doença clínica, mas não previnem a infecção (Manual, 1996; BENEDICTUS et al., 2000), além de reduzir a quantidade de microrganismos eliminados nas fezes (SHERMAN, 1987).

A implantação de programas de vacina 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).

A importância da doença de Johne não se restringe somente às perdas econômicas causadas à indústria animal, mas também a possível participação do MAP na ileocolite 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).

## 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.

Localizada sob as coordenadas  $01^{\circ}59''-04^{\circ}00''S$ ;  $44^{\circ}00''-45^{\circ}33''W$ , abrangendo uma área total de 17.579,366 Km<sup>2</sup>, (IBGE, 2015), a região constitui uma ampla diversidade de ricos ecossistemas, tais como rios, lagos, estuários e áreas alagavam, fazendo parte da Amazônia Legal Brasileira. São formadas pelas bacias hidrográficas dos rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Pericumã, Turiaçu e Aurá, que durante o pico das chuvas, entre os meses de abril e maio, acabam transbordando e suas águas inundam as planícies da região, mantendo os campos submersos durante praticamente seis meses do ano (VASCONCELOS, 2012) (Figura 01).

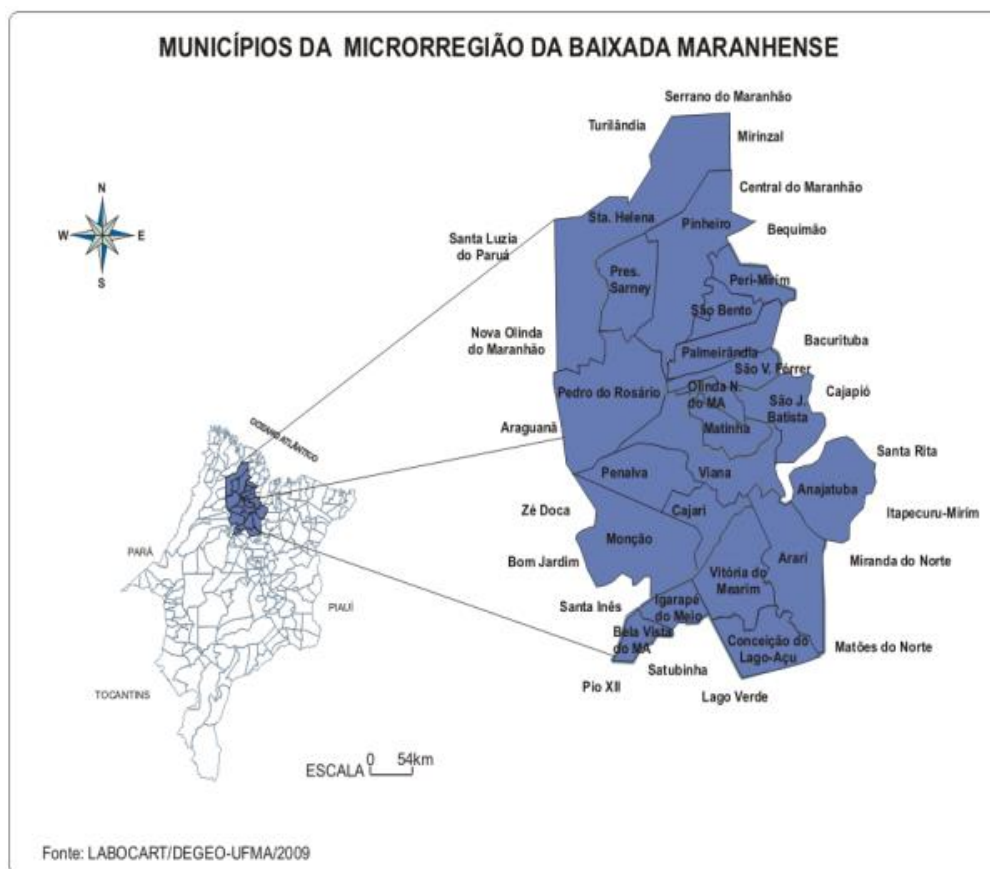


Figura 1. Mapa do Maranhão evidenciando a Baixada Maranhense e os municípios que a compõe.

## **4.2 AMOSTRAGEM**

O presente estudo foi realizado na população de búfalos da baixada maranhense, abatidos em matadouros dos municípios de Viana- MA e Ararí-MA, que recebiam uma grande demanda de animais, proveniente de várias cidades da região.

Tendo em vista a procedência dos animais através do Guia de Transporte Animal (GTA), fornecido pelo técnico responsável do abatedouro, foram selecionadas 115 (n= 66 fêmeas) e (n= 49 machos) com idade acima de 36 meses das raças de Murrah, Mediterrâneos e seus mestiços, assintomáticos. 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.

## **4.3 COLETA DE FRAGMENTOS DE TECIDO**

Entre os meses de agosto e setembro de 2015 foram realizadas visitas quinzenais, onde foram avaliados e coletados fragmentos de diversos órgãos. Primeiramente foi feita a lavagem dos tecidos, seguida da antissepsia e retirada de fragmentos dos linfonodos mesentéricos, intestino delgado e intestino grosso. As amostras coletadas eram devidamente acondicionadas em criotubos estéreis e posteriormente acondicionadas a -20°C até a realização dos testes moleculares.

## **4.4 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DA LESÃO**

As amostras das mucosas intestinais, linfonodos mesentéricos e válvulas ileoceais, oriundas dos animais abatidos, foram avaliadas segundo as suas características macroscópicas: espessamento da mucosa intestinal e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos.

## **4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

Foram coletadas 115 amostras de linfonodos mesentéricos, intestino delgado e grosso, estas por sua vez foram submetidas a realização do exame de bacterioscopia de órgãos. Para esse diagnóstico foram encontrados 26 animais positivos para a enfermidade paratuberculose de forma subclínica. Posteriormente esses 26 animais foram encaminhados para avaliação molecular, o qRT-PCR.

#### **4.6 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)**

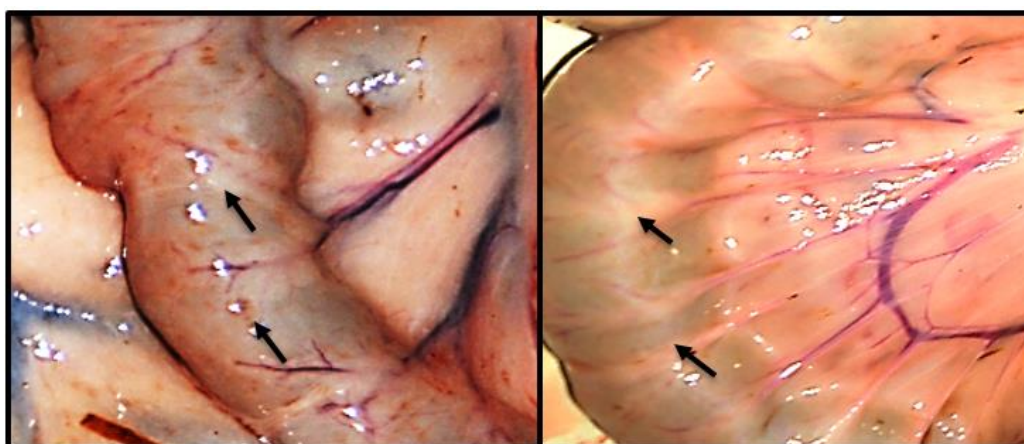
A extração do DNA foi realizada com o kit de extração Qiamp DNA Stool (Qiagen cat. 51504), conforme instruções do fabricante. Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25,0mL contendo: 5μL de DNA genômico; 1μL dos primers específicos para IS900 a 10μM (DF: 5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e o DR-1: 5'-CCGTAACCGTCATTGTCCAG3'); 5,5μL de água Mili-Q ultrapura e 12,5μL de Quanti- Fast SYBR Green PCR Kit (mistura para PCR - QIAGEN®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi realizado em um termociclador “Rotor-Gene Q”(QIAGEN) com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C por 20 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi utilizado o software “Rotor-Gene QSoftware v1.7” para acompanhar e realizou-se a interpretação dos resultados da qPCR. Para controle positivo e negativo foi utilizada uma cepa referência de Map e outra de *Mycobacterium bovis*, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

#### 5.1.1 VASOS LINFÁTICOS

Os vasos linfáticos do mesentério apresentam-se proeminentes e dilatados, por vezes tortuosos e esbranquiçados, estendendo-se desde a serosa das alças intestinais até o mesentério (Figura 2).



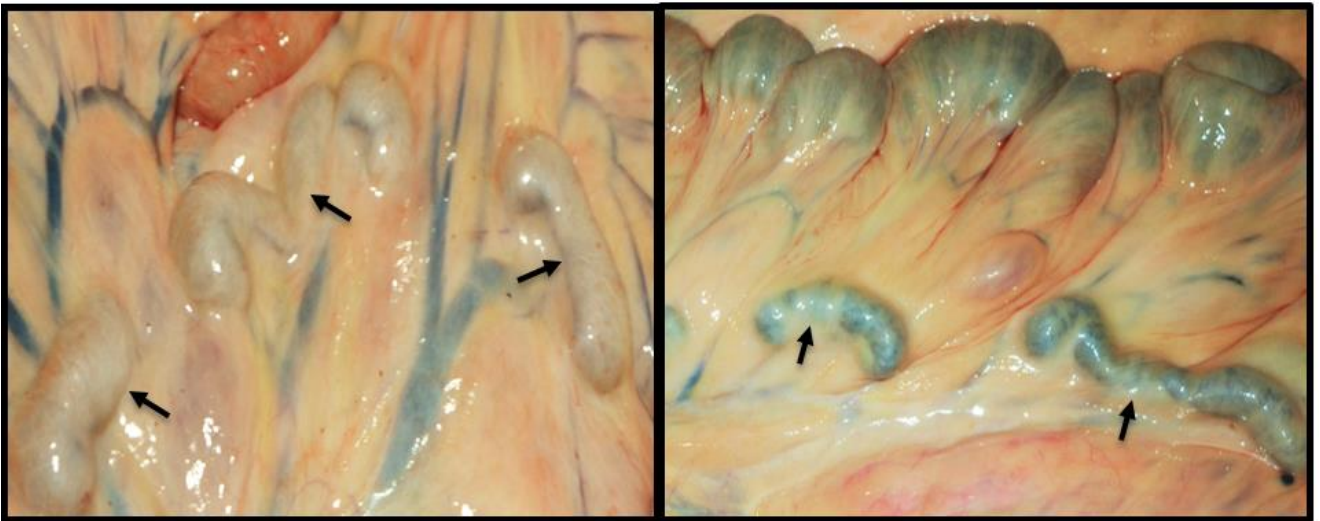
**Figura 2.** Fotografia dos vasos linfáticos subserosos de intestino delgado evidentes, esbranquiçados e tortuosos (aspecto varicoso). Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

Esta pesquisa assemelha-se com estudos descritos por Yamasaki e colaboradores no ano de 2010, em estudo com bovinos no estado do Rio de Janeiro, onde os vasos linfáticos do mesentério apresentavam por vezes tortuosos, esbranquiçados e em diversas regiões intestinais.

Esses vasos nitidamente visíveis e proeminentes devido à inflamação o que confere aspecto varicoso podendo se estender desde a serosa intestinal até o mesentério. A linfangite, comumente observada, é a característica macroscópica presuntiva do diagnóstico da paratuberculose à necropsia (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; MERKAL, 1984; DRIEMEIER et al., 1999). O espessamento e opacidade dos vasos linfáticos, em casos mais severos com aspecto tortuoso, visualizados *postmortem* desde o mesentério até a serosa das alças intestinais, se devem à linfangiectasia, perilinfangite e linfangite granulomatosas, que frequentemente estavam ocluídos (endolinfangite) pelo acúmulo de células inflamatórias, macrófagos e células gigantes, observados ao exame histopatológico. Esses achados foram frequentes em nossos animais e já descritos por pesquisadores (MOTA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2010).

### 5.1.2 LINFONODOS

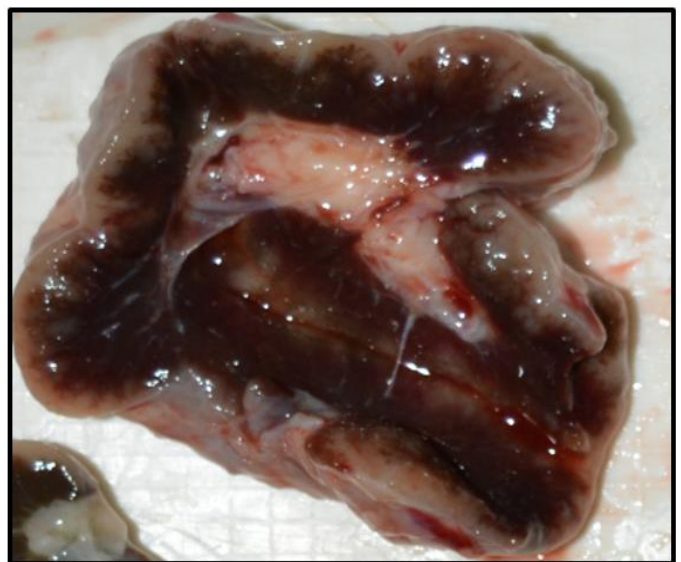
Os linfonodos mesentéricos estavam moderadamente hipertrofiados, úmidos brilhantes e protraídos ao corte, com a região medular em geral apresentando coloração marrom-escura, em alguns animais também havia nódulos esbranquiçados; já a região cortical estava espessada e com áreas irregulares e esbranquiçadas, de aparência multinodular com diâmetros variados e por vez notou-se presença de líquido com aspecto leitoso no seio medular (Figuras 3 a 5).



**Figura 3.** Fotografia da cadeia de linfonodos mesentéricos com um aumento de volume. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA,2015.



**Figura 4.** Fotografia de linfonodo mesentérico protraído ao corte, com região medular escura e cortical com áreas claras com acúmulo de líquido esbranquiçado leitosas. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

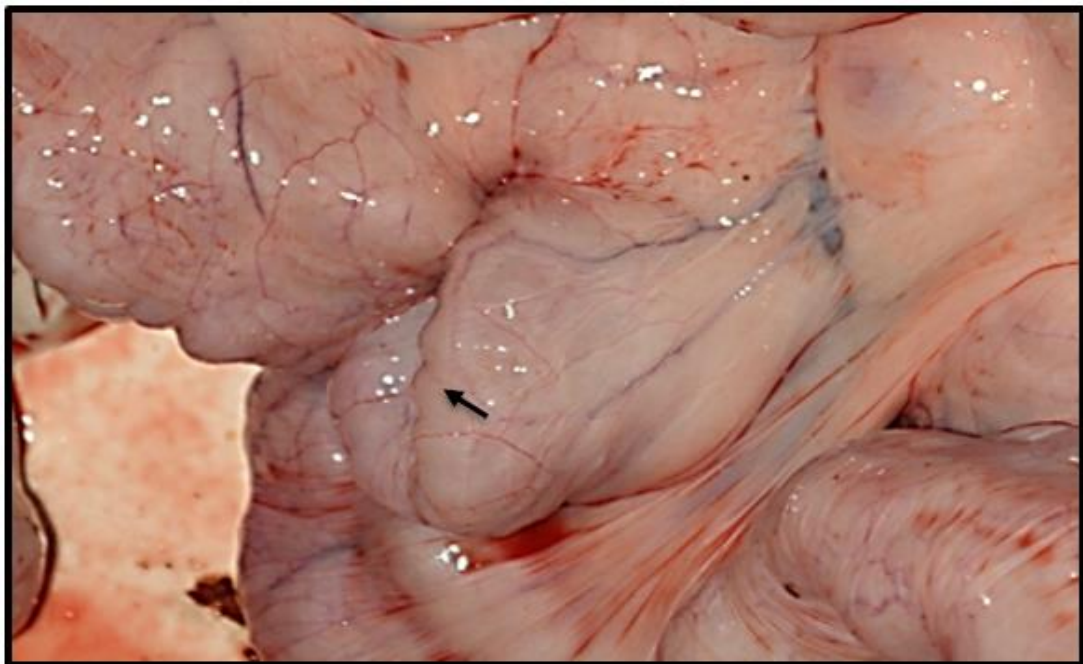


**Figura 5.** Fotografia de linfonodo mesentérico com região cortical marrom e medular enegrecida com acúmulo de material sanguinolento. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

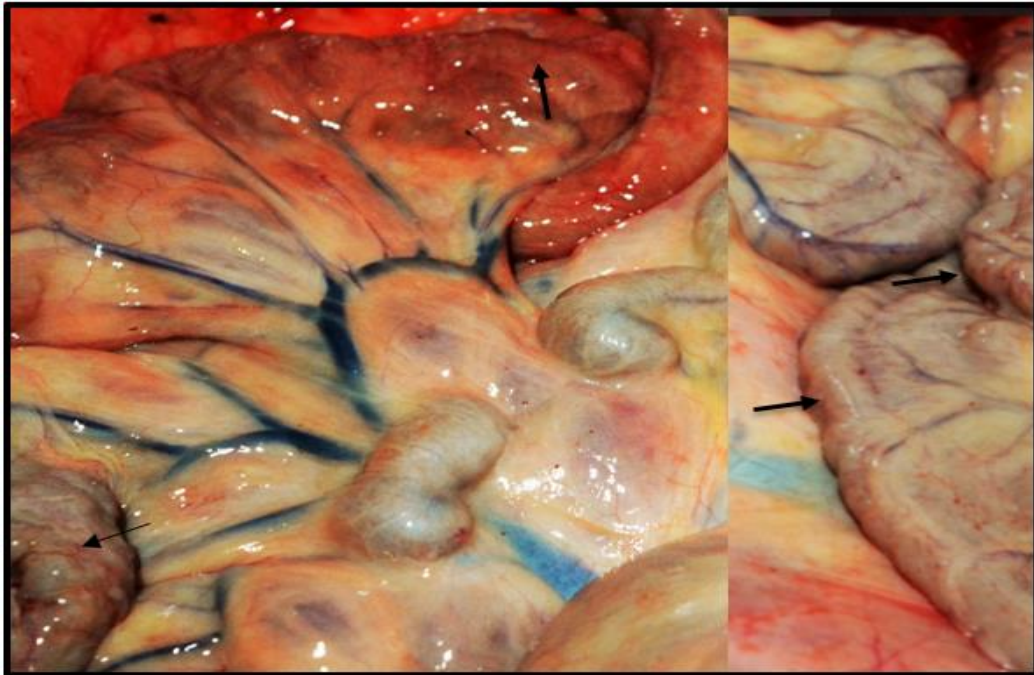
Esses linfonodos mesentéricos, principalmente os ileocecais estão normalmente aumentados. Algumas vezes, estão notadamente pálidos e edematosos, especialmente, na região medular. Linfangite e linfangiectasia são comuns. Os vasos linfáticos se mostram frequentemente como se fossem cordas espessadas traçadas da serosa mesentérica até os linfonodos mesentéricos. Frequentemente, somente a linfangite é observada como alteração macroscópica e é bastante específica para justificar um diagnóstico presuntivo de paratuberculose durante uma necropsia (CHIODINI et al., 1984; BARKER et al., 1993), confirmando a presença de lesões características da paratuberculose subclínica nos resultados obtidos.

### 5.1.3 INTESTINO DELGADO

Na cavidade abdominal observou-se as alças do intestino delgado, espessadas, com aspecto anelado e/ou cerebróide (Figuras 6 e 7).

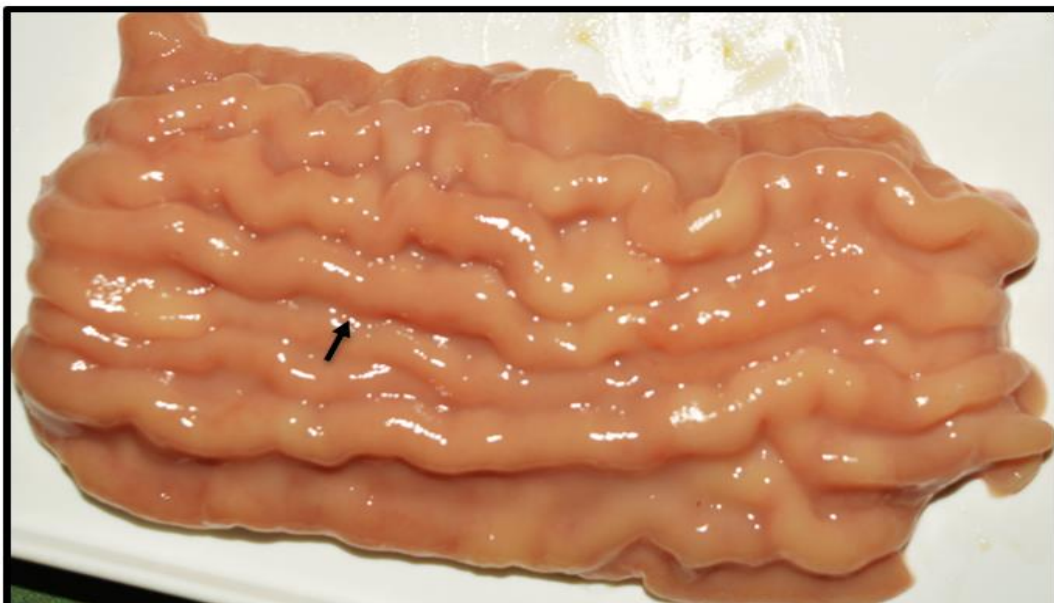


**Figura 6.** Fotografia da parede do intestino delgado dilatada e espessada, com aspectos cerebróides. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.



**Figura 7.** Fotografia da parede do intestino delgado espessada e enrugada, com aspecto cerebroides (seta). Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

À abertura do duodeno evidenciavam-se mucosas e superfícies irregulares e espessadas, enrugada ou pregreada, em determinados animais notou-se áreas com avermelhamento seguidas de hemorrágicas petequiais; havia conteúdo intestinal semi-líquido e pastoso de cor marrom-claro (Figura 8 e 9).

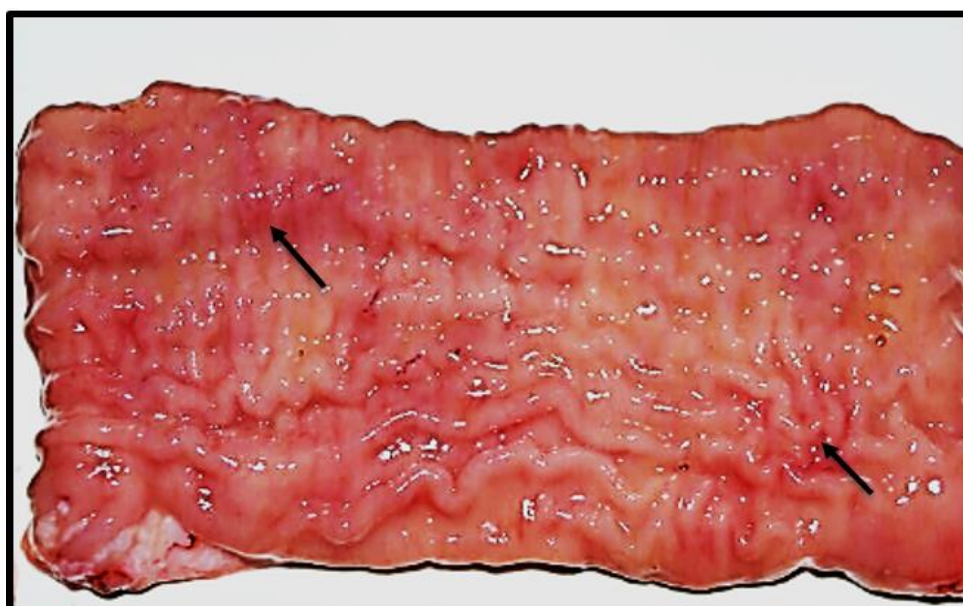


**Figura 8.** Fotografia da mucosa duodenal espessada, com aspecto enrugado. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.



**Figura 9.** Fotografia com evidente espessamento e pregueamento da mucosa duodenal com presença de conteúdo líquido amarronzado (seta). Paratuberculosesubclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

O jejuno também demonstrava a mucosa espessada, enrugada, com aspecto semelhante a giros cerebrais, com áreas difusas dessas lesões difusas ou irregulares; em geral as lesões restringem-se ao terço final do jejuno estendendo-se à porção final do íleo. Notou-se acúmulo de secreção viscosa de cor marrom-clara (Figura 10).

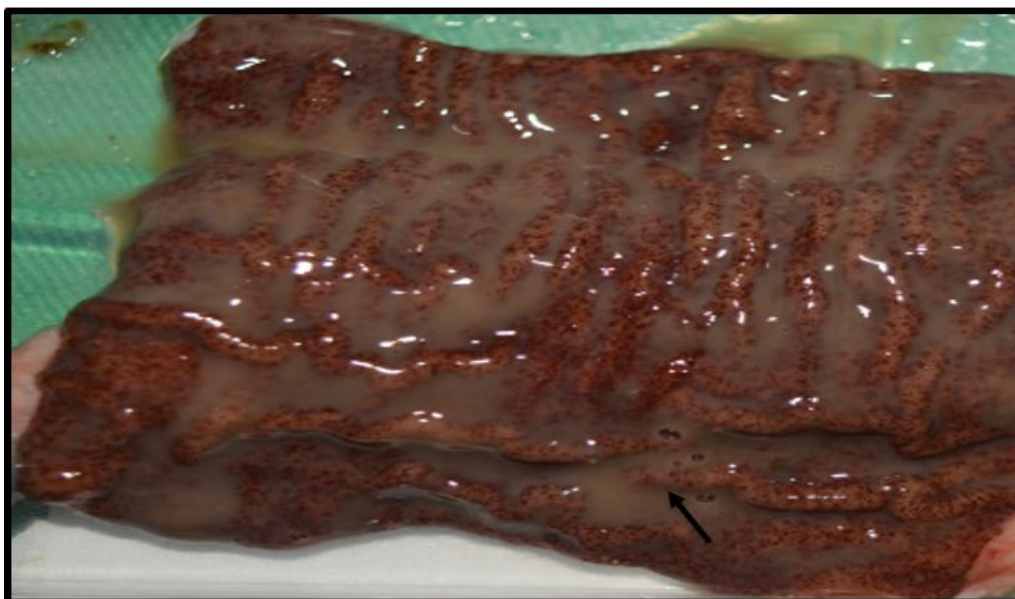


**Figura 10.** Fotografia da mucosa espessada e pregueada com áreas hiperêmicas (setas), observa-se conteúdo líquido amarronzado. Paratuberculosesubclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

No íleo evidenciava a parede espessada, com aspecto anelado e ou cerebróide, de aspecto proliferativo visível também na mucosa, o que muitas vezes dava um aspecto enrugado ou pregueado. Com frequência se via áreas avermelhadas difusas ou múltiplas petequias hemorrágicas (Figuras 11 e 12). Também nessa região do intestino as placas de Peyer eram muito evidentes, semelhante ao que se observou no jejuno de alguns animais. A mucosa apresentava aspecto finamente granular. O conteúdo do intestino delgado em geral era líquido e de cor verde-oliva claro o amarelado até marrom escuro.



**Figura 11.** Fotografia da mucosa espessada e pregueada com cor marrom-escuro. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.



**Figura 12.** Fotografia da mucosa espessada e pregueada, áreas com múltiplas petéquias hemorrágicas e presença de líquido semilíquido amarronzado. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

No duodeno, observaram-se estruturas polipóides na superfície da mucosa espessada, nos cortes histológicos dessas áreas, os achados histológicos correspondiam à proliferação de glândulas duodenais e intestinais, que conferia aspecto “arboriforme” à superfície da mucosa. Nessas áreas havia infiltração inflamatória semelhante a outras seções do intestino, porém em menor intensidade e não se via qualquer estrutura que pudesse sugerir parasitose ou outro processo patológico. Na literatura não se encontrou referência à lesão descrita, em animais com paratuberculose.

Segundo RAMOS e colaboradores (1986), as alterações macroscópicas, restritas ao intestino delgado, resumiam um quadro de enterite, caracterizada pela hipertrofia da mucosa intestinal e pelo aspecto cerebróide da mesma, além do aumento de volume dos linfonodos. A mucosa intestinal, em alguns casos, pode apresentar áreas levemente avermelhadas devido à congestão ou a múltiplas petéquias hemorrágicas, as quais podem ser detectadas em todo trato intestinal, tanto no intestino delgado quanto no grosso (DACORSO FILHO et al., 1960), Aspectos bem evidenciados no presente estudo, em búfalos positivos para paratuberculose de forma subclínica.

Já Driemeier e colaboradores (1999) ressaltaram para a diferenciação da aparência corrugada adquirida logo após a morte devido à persistência do peristaltismo, com o aspecto que é característico da doença; segundo Stehman (1990), nos casos de paratuberculose, ao estirar uma porção da alça intestinal esta aparência não desaparece.

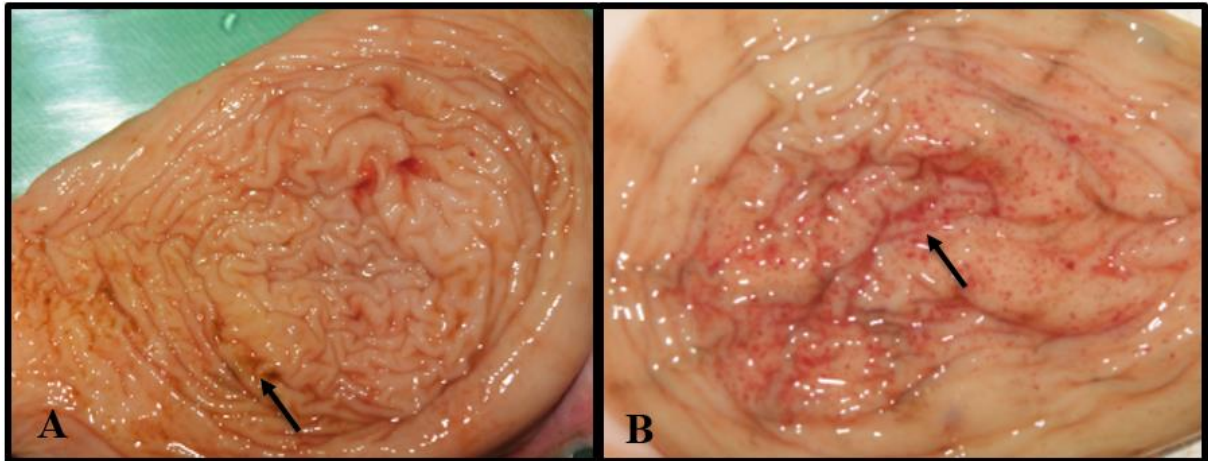
#### 5.1.4 INTESTINO GROSSO

A válvula íleo-cecal em geral estava edemaciada, com a mucosa espessada com pregas transversais, com aspecto microgranular na superfície.



**Figura 13.** Fotografia da válvula íleo-cecal aumentada de volume e edemaciada. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015

O Ceco apresentava-se distendido, com mucosa espessada, em alguns casos evidenciou-se regiões avermelhadas com múltiplas petequeais hemorrágicas de característica granular, o que confere aspecto reticulado. Observou-se acúmulo de líquido de cor vermelho-oliva (Figura 14).



**Figura 14.** Fotografia da mucosa dilatada, espessada, edemaciada com líquido verde-oliva (A); Ceco com mucosa dilatada e pregueada com áreas irregulares avermelhadas (B) paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

O cólon exibia, acentuado espessamento e evidente pregueamento. Notou-se, em determinados casos áreas avermelhadas e aspecto granular da mucosa. O conteúdo variava de pastoso a líquido de cor verde-oliva escuro (Figura 15).



**Figura 15.** Fotografia de pregueamento com áreas avermelhadas na mucosa enrugada. Notou-se líquido verde-oliva. Paratuberculose subclínica, Baixada Maranhense, MA, 2015.

As lesões na mucosa podem ocorrer do duodeno até o reto, sendo segmentadas ou contínuas. São mais desenvolvidas na região do íleo terminal e na parte inicial do intestino grosso. A região da válvula íleo cecal é também bastante afetada, normalmente, mostrando-se com tamanho aumentado (CHIODINI et al., 1984).

A ausência de um colapso completo da mucosa intestinal do íleo foi detectada por Gomes (2002) em casos de lesões acentuadas. O lúmen do íleo era mantido mesmo sem conteúdo no seu interior. A mucosa ileal se mostrava altamente espessada quando comparada com outras áreas do intestino. A alteração macroscópica clássica é o espessamento difuso da mucosa, a qual está revestida com rugas transversais, semelhantes às circunvoluções cerebrais. Esta acentuada hipertrofia da mucosa, normalmente observada no intestino delgado lhe confere um aspecto nitidamente cerebriode, sendo tal lesão proveniente do acúmulo de células inflamatórias crônicas e edemas na mucosa e submucosa (GOMES, 2002; SANTOS & SILVA, 1956), Seguindo assim ao encontrado no estudo.

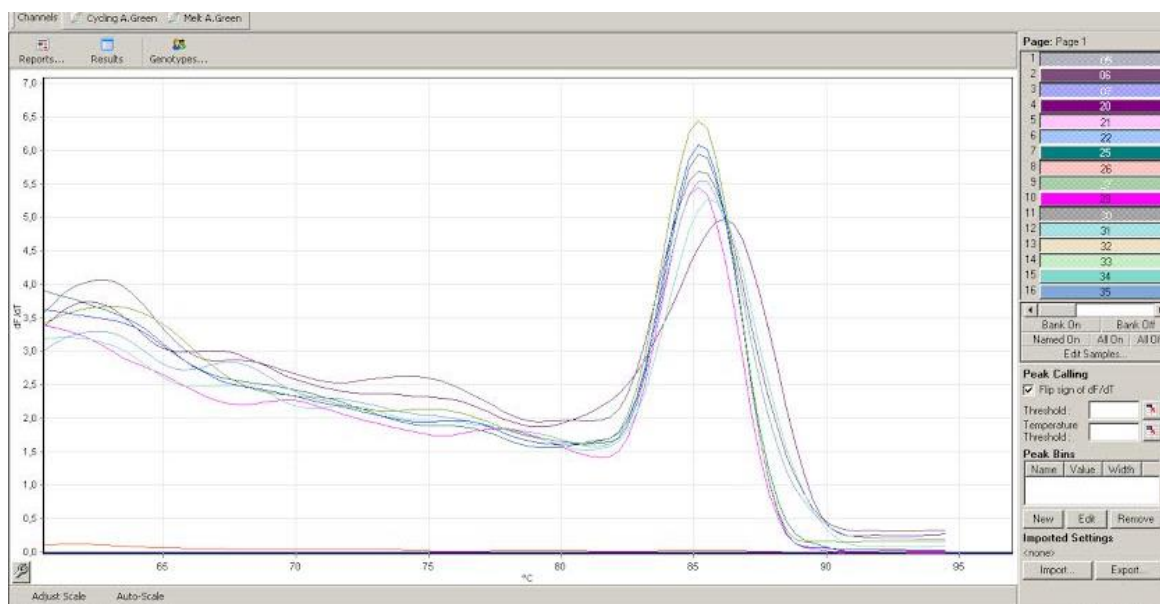
O aspecto cerebriode e anelado das alças intestinais, observados através da mucosa, decorrentes do acentuado espessamento da parede intestinal, foi atribuído à severa infiltração inflamatória, principalmente em mucosa e submucosa do jejuno e íleo. O comprometimento das camadas muscular e serosa do intestino, pela extensão da infiltração inflamatória da mucosa e submucosa altera a estrutura natural da parede luminal dos intestinos, promovendo uma baixa absorção.

E por sua vez a aparência enrugada da mucosa do intestino, comumente observada em animais com paratuberculose clínica, não desaparece quando o intestino é distendido (MERKAL, 1984; YAMASAKI et al. 2013); este achado não deve ser confundido com a alteração que ocorre logo após a morte devido à persistência do peristaltismo (DRIEMEIER, et al., 1999).

Essas lesões macroscópicas descritas foram observadas por diversos autores nacionais em bovinos (SANTOS & SILVA 1956, DACORSO-FILHO et al., 1960, SILVA & PIZELLI, 1961, PORTUGAL et al., 1979, DRIEMEIER et al., 1999, CUNHA et al., 2003, RISTOW et al., 2006, MOTA et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2008, MOTA et al. 2009, YAMASAKI et al., 2010) e bubalinos (REIS et al., 2015, MOTA et al., 2010, DALTO et al., 2012). Adicionalmente, alguns autores observaram mineralização das grandes artérias com a íntima dos vasos enrugada, esbranquiçada com aspecto opaco e confirmado ao exame histopatológico em bovinos (DRIEMEIER et al., 1999, CUNHA et al., 2003, YAMASAKI et al., 2010) e também em bubalinos (DALTO et al., 2012).

## 5.2 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Na PCR em tempo real se observou a amplificação da sequência genética IS900 específica para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em 57,7% (15/26) fragmentos de jejuno, íleo e linfonodo mesentérico. A identidade do fragmento foi confirmada pela comparação com outras sequências de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* do LABAD-UFRPE (Figura 16).



**Figura16.** Amostras de tecidos que tiveram seu material genético amplificado para o MAP. Linha de pico maior (controle positivo), linha de pico menos (controle negativo).

Em estudo realizado com búfalos no norte da Índia observou-se que de 25 linfonodos mesentéricos utilizados na pesquisa, 40,0% (10 amostras) foram positivos em IS 900 PCR (YADAV et al., 2007).

Segundo Clark et al. (2008), o uso de PCR em tecidos para detecção de Map nos rebanhos é muito útil, de grande sensibilidade, rapidez e confiável, desde que controles negativos e positivos sejam utilizados.

No Brasil, o primeiro estudo com o uso da técnica de diagnóstico PCRIS900 foi realizado por Rodrigues e colaboradores, no ano de 2005, em animais da espécie bovina, no Rio de Janeiro. Evidenciando o quanto a técnica de PCR é nova para estudos com Paratuberculose.

Já as primeiras pesquisas científicas com animais da espécie bubalina foram em Pernambuco por Mota e colaboradores no ano 2010, com o uso de diversas técnicas diagnósticas. Onde os resultados obtidos por eles pela técnica de PCR foram 15 (13%)

fragmentos de jejuno, íleo e linfonodo mesentérico de búfalos positivos para paratuberculose, se mostrando semelhante aos encontrados neste estudo.

Uma explicação para o uso da PCR é que quando a carga bacteriana é baixa, os bacilos álcool ácidos resistentes podem não ser detectados ao exame histológico, o que poderia explicar o resultado negativo na bacterioscopia e positivo quando submetido a avaliação molecular qTP-PCR (ZIMMER et al. 1999).

O controle da doença torna-se fragilizado, em virtude da natureza insidiosa da doença de Johne, ao lento desenvolvimento das lesões intestinais e à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos disponíveis, particularmente na população de animais infectados e assintomáticos (CHIODINI et al., 1984; NRCNA, 2003; OIE, 2012). Através do uso da técnica de qRT-PCR, foi possível detectar animais sob forma subclínica em búfalos provenientes de matadouros.

Técnicas do protocolo adotado podem ter interferido na amplificação e identificação do material genético submetido à análise neste estudo. Segundo Whittington et al. (1998), algumas amostras de tecidos intestinos e linfonodos mesentéricos podem apresentar-se negativas quando analisadas num primeiro momento, porém, quando reanalisadas após tratamentos com substâncias distintas, os quais poderiam minimizar os efeitos inibitórios para a amplificação da cadeia de DNA, resultaram positivas. Em nosso estudo, os tecidos não foram submetidos a uma segunda análise de PCR, e talvez por isso, a percentagem de amostras positivas nesta técnica tenha sido, relativamente, baixa.

No Brasil, a grande importância econômica da paratuberculose nos rebanhos bubalinos, principalmente na região da baixada maranhense, se dá por grandes perdas na produtividade desses animais, uma vez que se tornam ainda mais significativas quando associadas ao longo período de emagrecimento, relacionada com a diminuição de leite, baixa eficiência reprodutiva, descarte prematuro e redução do valor da carcaça ao abate, dificultando ainda o diagnóstico da mesma (BRITO et. al, 2014). Desta forma, a fim de proporcionar o diagnóstico da enfermidade, baseou-se nas alterações macroscópicas e pela amplificação do Map através de qRT-PCR.

Nesta pesquisa científica foi observada a ocorrência natural de 57,7% (15/26) da paratuberculose em búfalos, evidenciando resultados superiores aos encontrados por Sivakumar e colaboradores em 2006 na Índia e Reis e colaboradores em 2015 no estado do Maranhão. Uma possível explicação para esse elevado índice é estar associado à criação extensiva de búfalos na baixada maranhense, ou seja, não há controle e manejo sanitário

correto, favorecendo transmissão do Map para os animais jovens, uma vez que a infecção ocorre nos primeiros dias de vida (STABEL, 1998).

Devido à particularidade de a região ser de extensos lagos rasos, onde se desenvolve essencialmente a pecuária bubalina, (MUNIZ, 2007), ligados a vivência desses animais na água e escassez de manjo sanitário, é que se aponta um outro fator determinante na infecção dos búfalos com o MAP, uma vez que esses animais passam o dia nesses lagos e despejando suas excretas nestes locais, facilitando assim a contaminação por via orofecal.

Sendo assim, existem poucos estudos sobre a paratuberculose em bubalinos no Brasil, principalmente na região nordeste. Havendo assim escassez de dados epidemiológicos sobre a mesma. Por conseguinte, é importante ressaltar a relevância de estudos sobre a detecção e diagnóstico de doenças infectocontagiosas, principalmente aqueles que se manifestam de forma subclínica.

## 6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- ✓ A paratuberculose subclínica ocorre entre os rebanhos bubalinos abatidos em matadouros da Baixada Maranhense;
- ✓ Caracterizaram-se lesões macroscópicas de tecidos de linfonodos mesentéricos, intestinos delgado e grosso de búfalos com paratuberculose subclínica;
- ✓ Foi detectada a presença do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, em amostras de tecidos de provenientes de búfalos, com a técnica qRT-PCR (PCR Quantitativo em Tempo Real).

Os métodos moleculares utilizados no referido estudo mostraram ser uma vantajosa ferramenta diagnóstica, devido à rapidez, sensibilidade e especificidade para detecção de Map.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACYPRESTE, C.S., JULIANO, R.S., RIVEIRA, F.E.B., SILVA, L.A.F., FIORAVANTI, M.C.S. & DIAS-FILHO, F.C. **Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti - *Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação.** Ciênc. Anim. Bras. v. 6, n. 1, p. 55-59, 2005.

AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO. Coordenadoria de Defesa Animal. Programa de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa. Efetivo de bovídeos leiteiros do Estado do Maranhão. Out. 2015.

ALBERTS, B. et al. **Tecnologia do DNA recombinante.** In: \_\_\_\_\_. *Biologia Molecular da Célula*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 7. p.291-334, 1997.

ALTWEGG, M. **General problems associated whit diagnostic applications of amplification methods.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 23, n. 1, p. 21-30, 1995.

ALINOVI, C. A. et al. **Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.** *Veterinary Microbiology*, v. 136, n. 1-2, p. 177–179, 2009.

BANNANTINE, J.P.; BAECHLER, E.; ZHANG, Q.; LI, L.; KAPUR,V. **Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, p.1303-1310, 2002.

BARCELOS, D.; FRANCO, M. F.; LEÃO, C. **Effects of tissue hand lingand processing stepson PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin embedded samples.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, n. 6, p. 321-326, 2008.

BARCLAY, R. **The role of iron in infection.** *Medical Laboratory Science*, v. 42, p. 166-177, 1985.

Barker, I., Van Dreumel, A., Palmer, N. The alimentary system. In: **Pathology of domestic animals**, 4ª edição. Editores: K. Jubb, P. Kennedy e N. Palmer. San Diego: Academic Press Inc. (San Diego), p. 1-318, 1993.

BENEDICTUS, G., VERHOEFF, J., SCHUKKEN, Y. H., HESSELINK, J.W. **Dutch paratuberculosis programme history, principles and development.** *Veterinary Microbiology*. v.77. p. 399-413, 2000.

BERNARDES, O. **Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.293-298, 2007.

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

BLOOD, D. C., HENDERSON, J. A., RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1121, 1983.

BÖLSKE, G.; HERTHNEK, D. Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: BERHS, M. A.; COLLINS, D. M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International. Cap. 23, 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.

BUERGELT, C. D., & GINN, P. E. **The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*)**. Veterinary Microbiology, v. 77, n. 3, p. 325-331, 2000.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, p. 249, 1988.

CASTELLANOS, E., ARANAZ, A. & BUCK, J. **Rapid identification and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 locus**. J. Clin. Microbiol. 48(4):1474-1477, 2010.

CLARK JR D.L., KOZICZKOWSKI J.J., RADCLIFF R.P., CARLSON R.A. & ELLINGSON J.L.E. **Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serumenzyme-linked immune sorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction**. J. DairySci. 91:2620- 2627, 2008.

CHIODINI, R. J. et al. **Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease**. Digestive diseases and sciences, v. 29, n. 12, p. 1073-1079, 1984.

CHIODINI, R. J.; VAN KRUININGEN, H. J.; MERKAL, R. S. **Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects**. Cornell Veterinarian, v. 74, p. 218-262, 1986.

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

CLARKE, C. J. **The pathology and Patogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species**. Journal of Comparative Pathology, v. 116, p. 217-261, 1997.

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J., MERKAL, R. S. **Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects**. Cornell Veterinary, v. 74, p. 218- 262, 1984.

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

COLLINS, M.T. **Bacterial Diseases (Paratuberculosis – Doença de Johne’s)**. In: Howard, J.L., Smith, R.A. Current Veterinary 4 therapy - Food Animal Practice. W.B. Saunders Company, p.344-346. 1999

CORRÊA, W. M., & CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. MEDSI, Rio de Janeiro, p. 202, 1992.

COUSINS, D.V., DASON, D.J. **Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994**. Int. J Tuberc. Lung Dis.,v. 3,p. 715-721, 1999.

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. v. 44, p. 1-5, 2012.

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

DIAS, L. D. et al. **Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose**. In: Anais 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, RS, 2002.

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

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

EELES, R. A.; WARREN, W.; STAMPS, A. **The PCR revolution**. European Journal of Cancer, v. 28, n. 1, p. 289-293, 1992.

ENGLUND, S., BÖLSKE, G., JOHANSSON, K. **An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***. FEMS Microbiology, v. 209, n. 2, p. 267-271, 2002.

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.

FISS, E. H.; YU, S.; JACOBS, W. R. **Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways.** *Molecular Microbiology*, v. 14, p. 557-569, 1994.

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.

GARCIA, S.K., AMARAL, A., SALVADOR, D.F. **Situação da bubalinocultura mineira.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.29, n.1, p.18-27, 2005.

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.

GRANZIERA, M. L. M. **Direito Ambiental.** São Paulo: Atlas, 2009.

GWOZDZ, J. M. et al. **Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction.** *Veterinary Microbiology*, v. 51, p. 233-244, 1997.

HERTHNEK, D. et al. **Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 1095-1102, 2006.

HUTCHINSON, L. J. **Economic impact of paratuberculosis.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 12, n. 2, p. 373-381, 1996.

HUYGEN K., BULL T., COLLINS D. M. **Development of new paratuberculosis vaccines, in Paratuberculosis: Organism, Disease, Control**, eds Behr M. A., Collins D. M., editors. (Oxfordshire: CAB International; ),p. 353–368, 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis **Diagnostico da Bubalinocultura na Baixada Ocidental Maranhense, Especialmente no Município de São João Batista e Seus Impactos Ambientais.** São Luís: 1989.

IBGE. **Diretoria de Pesquisas, Coordenação e Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2015.** Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 05 Fev. 2016.

JOHNE, H. A. & FROTHINGHAM, L. **Ein eigenthuemlicher fall von tuberculose beim rind.** *Dtsch. Z. Tiermed. Pathol*, v. 21, p. 438-454, 1895.

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

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Moléstias causadas por bactérias.** In: *Patologia Veterinária*. 6 ed. Manole. São Paulo: cap. 10, p. 509-513, 2000.

KAUR, P., FILIA, G., SINGH, S.V., PATIL, P.K., RAVI-KUMAR, G.V. & SANDHU, K.S. **Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34(2):163-169, 2011.

KHAN, F. A. et al. **Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues samples of cattle and buffaloes.** *Tropical Animal Health and Production*, v. 42, p. 633-638, 2010.

KHOL, J. L. et al. **Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissues and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations.** *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 72, n. 10, p. 1283-1288, 2010.

KREEGER, J. M. **Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 3, n. 4, p. 373-383, 1991.

LAMBRECHT, R. S., & COLLINS, M. T. ***Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence.** *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 15, n. 3, p. 239-246, 1992.

LARSEN, A. B.; MERKAL, R. S.; CUTLIP, R. C. **Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*.** *American Journal of Veterinary Research*, v. 35, p. 255-257, 1975

LOGAR, K., BANDELJ, P., STARIČ, J., LAPANJE, A., & OCEPEK, M. **Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA.** *BMC veterinary research*, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.

MANNING, E. J., & COLLINS, M. T. ***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis.** *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v. 20, n. 1, p. 133-150, 2001.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines: **lists A and B diseases of mammals, birds and bees.** 3 th ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 218-228, 1996.

MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA: **Manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário.** 7. Ed. São Paulo: Roca, p. 483-485, 1997.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)** / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vítor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília, 2006.

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. v. 32, n. 8, p. 697-700, 2012.

MERKAL, R. S., LARSEN, A. B., & BOOTH, G. D. **Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis.** American Journal of Veterinary Research, v. 36, p. 837-838, 1975.

MERKAL, R. S. **Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods.** Journal of American Veterinary Medical Association, v. 182, p. 939-943, 1984.

MCFADDEN, J. J. et al. **Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species.** Journal of Clinical Microbiology, v. 25, p. 796–80, 1987.

MOTIWALA, A.S., Li L., KAPUR V. & SREEVATSAN S. **Current understand of genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.** Microb. Infect.8:1406-1418, 2006.

MOMOTANI, E. et al. **Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves.** Veterinary Pathology Online, v. 25, n. 2, p. 131-137, 1988.

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, v. 74, n. 2, p. 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, L. M. **A criação de Búfalos na Baixada Maranhense: uma análise do desenvolvimentismo e suas implicações sócio-ambientais.** III Jornada Internacional De Políticas Públicas, 2007.

MURPHY, P., HILL, C., AUTY, M., ROSS, P. **Effect of Lacticin on the growth of *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP).** In: International Colloquium on Paratuberculosis. Section 1. p.18, 2002.

NAKAJIMA, M., MAIA, F. C. L., MOTA, P. M. P. C. **Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais.** In: IV Simpósio Brasileiro em Micobactérias, Bauru, São Paulo, Trabalho 67, 1991.

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)**, 2012. Disponível em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf)  
Acesso em: 01 Maio 2016.

OLIVEIRA, D. M. et al. **Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba**. In: Encontro Nacional do Diagnóstico Veterinário (Endivet), Campo Grande, MS, p. 203-204, 2008.

OLSEN, I., SIGURDARDOTTIR, O.G., DJONNE, B. **Paratuberculosis with especial reference to cattle. A review**. Veterinary Quarterly, v. 24, p. 12-28, 2002.

POESTER, F. P., & RAMOS, E. T. **Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina**. Ciência Rural, v. 24, n. 2, p. 333- 337, 1994.

POLJAK, M., SEME, K., KOREN, S. **The polymerase chain reaction: A critical review of its uses and limitations in diagnostic microbiology**. Period Biol, v. 98, p. 183-90,1996.

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

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFF, K. W., & CONSTABLE, P. D. (Ed.). **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, 2006.

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.

REIS, A. S. B., BRITO, M. F., JÚNIOR, P. S. B., FONSECA, A. A., JÚNIOR, D. G., MOTA, R. A., ... & BARBOSA, J. D. **Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos**. Pesq. Vet. Bras, v. 35, n. 10, p. 823-828, 2015.

RIVEIRA F.E.B. **Levantamento sorológico utilizando-se a técnica ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose**. Anais Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul. Campo Grande, MS, p. 20-22, 1996.

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.

RODRIGUES, C.F.C.; IAPICHINI, J.E.C.B.; LISERRE, A.M.; SOUZA, K.B. DE; FACHINI, C.; REICHERT, R.H. **Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista**. Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária. p.100-109, 2008.

SANDERSON, J. D. et al. ***Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue**.Gut, v. 33, p. 890–896, 1992.

SANTOS, J. A. & SILVA, N. L. **Sobre a 1ª Observação da paratuberculose no Brasil.** Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, v. 24, p. 5-14, 1956.

SEFFNER, W. Paratuberculose. In: **Doenças infecciosas em animais domésticos.** São Paulo: Roca, p. 286-289, 1988.

STEHMAN, S. M. Moléstia de Johne (Paratuberculose). **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, v. 1, p. 823-829, 1990.

STEHMAN, S.M. Moléstia de Johne (paratuberculose). In: SMITH, B.P.(Ed). **Tratado de Medicina Veterinária Interna de Grandes Animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos.** São Paulo: Manole, p. 823-830, 1993.

STERNBERG, S., BÖLSKE, G., ROBERTSSON, J. A., OLSSON, S. O., VISKE, D. **Screening of Swedish dairy farms for paratuberculosis.** In: International Colloquium on Paratuberculosis. Section 7. p.105-106, 2002.

SCHROEN, C. J.; KLUVER, P. F. ; BUTLER, K.; McDONALD, W. L.; HOPE, A. F.; CONDRON, R. J. **Factors affecting the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in soil.** In: **International Colloquium on Paratuberculosis.** International Association for Paratuberculosis. Section 1, p.16-17, 2002.

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

SIGURDARDOTTIR, O. G. et al. **Bacterial isolation immunologic response and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.** Veterinary Pathology, v. 36, p. 542-550, 1999.

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, N. M. **Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 3, p. 285-289, 1968.

SILVA, N. M., PIZELLI, G. N. **Estudos sobre a paratuberculose I. Diagnóstico de um caso de da doença.** Arquivos do Instituto de Biologia Animal, v. 4, p. 169-173, 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. & SHARMA, A.K. **Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*).** Veterinary Pathology Online, v. 43, n. 4, p. 455-462, 2006.

SNOW, G. A. **Mycobactins: iron chelating growth factors from micobacteria.** Bacteriology Review, v.81, p. 99 – 125, 1970.

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

SWEENEY, R. W. **Transmission of paratuberculosis.** Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, v. 12, n. 12, p. 305-312, 1996.

TAYLOR, A. W. **The experimental infection of cattle with varieties of Mycobacterium johnei isolated from sheep.** Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, v. 63, p. 368-373, 1953.

TIMMS, V. J., GEHRINGER, M. M., MITCHELL, H. M., DASKALOPOULOS, G., & NEILAN, B. A. **How accurately can we detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection?** Journal of Microbiological Methods, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2011.

TWORT, F. W. **A method for isolating and growing the lepra bacillus of man (preliminary note).** Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character, v. 83, n. 562, p. 156-158, 1910.

TWORT, F. W. & INGRAM, G. L. Y. **A method for isolating and cultivating Mycobacterium enteridis 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 Londos, v. 84, p. 517-543, 1912.

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

VALLEÉ, H. & RINGJARD, P. **Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovides.** Revue Générale de Médecine Vétérinaire, v. 43, p. 777-779, 1926.

YAMASAKI, E.M., BRITO, M.F., MOTA, R.A., MCINTOSH, D. & TOKARNIA, C.H. **Paratuberculose em ruminantes no Brasil.** Pesq. Vet. Bras. v. 33, n. 12, p. 1427-1432, 2013.

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. **Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro.** Pesq. Vet. Bras. v. 30, n. 11, p. 921-932, 2010.

WHITLOCK, R. H., & BUERGELT, C. **Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology).** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 12, n. 2, p. 345-356, 1996.

WHITTINGTON, R., MARSH, I., CHOY, E., COUSINS, D. **Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to Mycobacterium avium and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, can be used to distinguish between and within these species.** Mol Cell Probes, 12: 349-358, 1998.

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.

ZIMMER, K., DRÄGER, K.G., KLAWONN, W., HESS, R.G. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. **Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe“ test in detecting Mycobacterium paratuberculosis in faeces from cattle.** J Vet Med B, 46: 137-140, 1999.