

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Érica Bandeira da Silva

DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM BOVINOS DE CORTE
DO ESTADO DO PARÁ-BRASIL

Belém - Pa
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA –
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Érica Bandeira da Silva

**DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM BOVINOS DE CORTE
DO ESTADO DO PARÁ-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia
Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hilma Lúcia Tavares Dias.

Belém - Pa
2005

Silva, Érica Bandeira da

Diagnóstico da paratuberculose em bovinos de corte do Estado do Pará – Brasil / Érica Bandeira da Silva; orientadora, Hilma Lúcia Tavares Dias – Belém: [s.n.], 2005.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, 2005.

1. Bovinos – Doenças – Pará. 2. Paratuberculose – Diagnóstico. I. Título.

CDD 636.20896

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA –
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Érica Bandeira da Silva

DIAGNÓSTICO DA PARATUBERCULOSE EM BOVINOS DE CORTE DO
ESTADO DO PARÁ-BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Data : 01 / 04/ 2005

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Hilma Lúcia Tavares Dias – Presidente
Universidade Federal do Pará – UFPA

Prof. Dr. José de Arimatéa Freitas – Membro Titular
Universidade Federal Rural da Amazônia –UFRA

Prof. Dr. Cláudio Vieira de Araújo – Membro Titular
Universidade Federal Rural da Amazônia –UFRA

Prof^a. Dr^a Nazaré Fonseca de Souza – Suplente
Universidade Federal Rural da Amazônia –UFRA

Belém-Pa

2005

EPIÍGRAFE

“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar
agora e fazer um Novo Fim.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

As minhas mães, pelo infinito amor, dedicação e atenção. Incansáveis mulheres que com toda simplicidade educaram-me com valores grandiosos como o respeito, a humildade e o amor. Amo vocês, D. Júlia e D. Rosemary Bandeira.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo dom da vida.
- A **Universidade Federal do Pará**, pela oportunidade oferecida.
- A Dr^a. **Hilma Lúcia Tavares Dias**, pela orientação, amizade e confiança em todos os momentos.
- Ao **CNPq**, pela concessão de bolsa de estudos .
- À Cooperativa da Indústria Pecuária do Pará LTDA - **SOCIPE**, pela obtenção das amostras para execução deste trabalho.
- À minha **família**, pelo apoio, compreensão e carinho fornecido.
- Ao meu querido amado, **Fernando Azevedo**, pela compreensão, incentivo, cumplicidade e amor em todos os momentos.
- Aos meus **amigos** pelos bons momentos de dispersão e alegria.
- À minha grande amiga **Cleane Pessoa**, pelo companheirismo e incentivo nos momentos difíceis e, pelos bons momentos de longas conversas e risos.
- À amiga **Andréa Maria Góes Negrão**, pela amizade, sugestões e apoio durante as coletas ao matadouro, além de muitas boas risadas.
- Aos **colegas do curso**, pela boa convivência e amizade.
- Ao **LAPA** pelo apoio em todos os momentos em que foi solicitado.
- Aos **bibliotecários** da **UFRA, EMBRAPA e UFPA**.
- À todos os **funcionários do biotério**, pela amizade e apoio.
- Enfim, a todos que caminharam junto comigo.

SUMÁRIO

N.	Título	Página
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
	LISTA DE TABELAS	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	HISTÓRICO.....	14
2.2.	ETIOLOGIA	15
2.3.	PATOGENIA	16
2.4.	EPIDEMIOLOGIA	18
2.5.	SINAIS CLÍNICOS	23
2.6.	PATOLOGIA	25
2.7.	DIAGNÓSTICO	26

2.7.1.	Método Direto	27
2.7.2.	Método indireto	28
2.7.2.1.	Testes sorológicos	29
	a) Teste de Fixação do Complemento (FC)	29
	b) Teste de Imunodifusão em Agar Gel (IDAG)	30
	c) Teste de dosagem de Gama interferon (?IFN)	30
	d) Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	30
2.7.2.2.	Teste de hipersensibilidade	32
2.8.	CONTROLE E PROFILAXIA	32
3.	OBJETIVOS	34
3.1.	OBJETIVO GERAL	34
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1.	ANIMAIS	35
4.2.	COLHEITA DAS AMOSTRAS	38
	✓ SANGUE.....	38

✓	LINFONODOS MESENTÉRICOS E FRAGMENTOS DE INTESTINO DELGADO	38
4.3.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	39
4.3.1.	ELISA indireto	39
4.3.2.	Bacteriologia	40
4.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5.	RESULTADOS	41
6.	DISCUSSÃO	47
7.	CONCLUSÕES	52
8.	REFERÊNCIAS	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura n.	Título	Página
Figura 1 –	Mapa representativo, demonstrando os municípios onde foram colhidas as amostras no Estado do Pará, Brasil	37
Figura 2 -	Teste ELISA indireto realizado nas fêmeas entre os grupos de idade estudados, a fim de detectar anticorpos anti-MAP.	45
Figura 3 –	Resposta ao Teste de ELISA indireto, para detecção de anticorpos anti-MAP, realizado nos machos em relação a idade	46

LISTA DE TABELAS

Tabela n.	Título	Pg.
Tabela 1 -	Mesorregiões do Estado do Pará de onde originaram as amostras colhidas	38
Tabela 2 -	Distribuição das amostras de acordo com o sexo dos animais em estudo	38
Tabela 3 -	Distribuição das amostras de acordo com a idade dos animais em estudo	38
Tabela 4 -	Resultado do teste de ELISA indireto para identificação de anticorpos anti- MAP de acordo com a mesorregião, Estado do Pará, 2005.....	42
Tabela 5 -	Resultado do teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti – MAP segundo a faixa etária dos animais	43
Tabela 6 -	Resultado da prevalência de animais soro-positivos e soro-negativos, de acordo com o sexo do animal, obtidos através do teste de ELISA indireto	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
FC	FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO
IDAG	IMUNODIFUSÃO EM AGAR GEL
IgG	IMUNOGLOBULINA G
LIDEA	LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES ANIMAIS
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp.) <i>paratuberculosis</i>
PBS	TAMPÃO FOSFATO SALINO
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE
PPD	PROTEÍNA PURIFICADA DERIVADA AVIÁRIA
SAS	STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM
SOCIPE	COOPERATIVA DA INDÚSTRIA PECUÁRIA DO PARÁ
UFPA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
?IFN	GAMA INTERFERON

RESUMO

514 amostras de sangue bovino foram analisadas para detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, utilizando um kit comercial do teste ELISA indireto. Os animais eram todos mestiços, machos e fêmeas, classificados em dois grupos, de acordo com a idade, menores ou iguais a 36 meses e maiores de 36 meses, provenientes de 23 municípios do Estado do Pará. Além deste teste, também foram colhidas 100 amostras de fragmentos de intestino delgado e de linfonodo mesentérico para análise bacteriológica através da coloração de Ziehl-Neelsen, a fim de identificar o *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*. As amostras foram colhidas aleatoriamente em matadouro da região metropolitana de Belém. No teste ELISA indireto, das 514 amostras de sangue bovino 182 (35,4%) foram reagentes para anticorpos anti-*Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* e 332 (64,6%) foram não-reagentes. Em todas as mesorregiões encontraram-se animais soropositivos. As fêmeas com idade superior a 36 meses mostraram maior respostas ao teste, 92,06% de animais soropositivos. Entre os machos, a maior prevalência (76,79%), foi obtida nos mais novos, com idade abaixo de 36 meses. Das 100 lâminas coradas através do método de Ziehl-Neelsen, nenhum *Mycobacterium sp.* foi identificado. Conclui-se assim, que o elevado número de animais com anticorpos anti-*Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* indica a presença da doença em todas as mesorregiões estudadas, devendo-se atentar aos riscos desta enfermidade, através de pesquisas mais abrangentes sobre a Paratuberculose, com aplicação de métodos diagnósticos diretos e indiretos.

Palavras chave: *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, bovinos, ELISA, Ziehl-Neelsen, Belém, Pará., Brasil.

ABSTRACT

514 blood samples from beef cattle were examined to find anti- *M. avium* (subsp.) *paratuberculosis* antibodies, using commercial ELISA test kit. The animals from samples were all composed from cross between *Indicus* x *Taurus* race, between male and female, with two age classes, over 36 months old and below 36 months old, from of the 23 municipality of Para State. Also were collected 100 samples of small intestine and mesenteric lymph nodes of bacteriological test through Ziehl-Neelsen method to detect the *M. avium* (subsp.) *paratuberculosis*. Were at random collected in slaughterhouse of Belem. In ELISA test, through these 514 samples, 182 (35,4%) were seropositive and 332 (64,6%) samples were seronegative. All the middle region were found seropositive animals. The female with over 36 months old presented larger response test, of the 92,06% seropositive animals. Among male the prevalence larger (76,79%,) were obtained between the most new, with below 36 months old. Of 100 samples stained through Ziehl-Neelsen method, not were found either *Mycobacterium spp.*. The conclusion, is the biggest number of seropositive animals of anti- *M. avium* (subsp.) *paratuberculosis* sign of disease is presented in all the regions studied, watching the risks of this disease with the elaborate more covering studies about the paratuberculosis with the applying of direct and indirect diagnosis methods.

Key words: *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, cattle, ELISA, Ziehl-Neelsen., Pará, Brazil.

1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose é uma doença de caráter crônico, que afeta ruminantes em geral (Seffner, 1988). Apresenta uma forma clínica, quando se observa enterite crônica, perda de peso e fraqueza que, geralmente leva o animal a óbito. E ainda uma forma subclínica, quando não há nenhum sinal da doença, no entanto, há eliminação do agente no ambiente tornando-se uma fonte de risco ao rebanho ou animais próximos (Blood *et al.*, 1983; Stehman, 1993). Embora ainda não haja comprovação científica, seu agente causador o *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* é incriminado na doença em seres humanos, a Doença de Crohn (Stabel, 1998).

Muitos a consideram como uma doença nova, emergente. No entanto, foi descoberta em 1895 na Alemanha (Silva, 1990), quando permaneceu por muito tempo sem diagnóstico ou sendo diagnosticada de maneira errada, obtendo importância mundial a partir do momento em que proporcionou altos prejuízos econômicos, principalmente nos rebanhos leiteiros de grandes centros produtores, aumentando os custos sanitários devido ao longo período de enfermidade (Blood *et al.*, 1983; Driemeier *et al.*, 1999). Em alguns países, apresentam perda de aproximadamente US\$ 100,00 por vaca, além de uma redução de 700kg de leite por vaca. (Stephen *et al.*, 1999).

Ainda não há um teste padrão para o diagnóstico da paratuberculose devido à natureza crônica da enfermidade e os diferentes estágios da doença (Buergelt & Ginn, 2000). O diagnóstico da doença, no entanto, é feito com maior frequência através da cultura de fezes dos animais suspeitos, porém este exame é demorado devido à característica de crescimento lento da bactéria, o que pode levar meses até o diagnóstico final (Carter, 1988). Por isso, atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) está sendo usado, como o teste de eleição

devido sua praticidade, baixo custo, proporcionando a realização de exame de um grande número de amostras de uma só vez (Van Maanen *et al.*, 2002). O que apresenta um papel significativo nos programas de controle internacionais (Dargatz *et al.*, 2002).

No Brasil, a preocupação com a doença ainda é discreta. Pois, é observado o crescente número de publicações de trabalhos científicos no país, principalmente na Região Sudeste - Rio de Janeiro e Minas Gerais - e Região Sul do Brasil - Santa Catarina e Rio Grande do Sul - apenas a partir da última década (Driemier *et al.*, 1999).

Faz-se necessário o conhecimento da prevalência da paratuberculose no país, e, sobretudo em nossa região, a fim de combatê-la o quanto antes, evitando que se torne uma ameaça nacional. É importante uma maior preocupação científica local, através de levantamentos de dados reais sobre a sua prevalência, evitando graves prejuízos econômicos à pecuária da região Norte e de outras regiões do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

O *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (MAP) foi descoberto por John e Frothingham em 1895 (Carter, 1988). Sendo observado primeiramente em lesões intestinais de bovinos e confundido com o bacilo tipo aviário, em Dresden, na Alemanha (Silva, 1990). A doença então, foi considerada uma forma especial de tuberculose e somente onze anos depois, em 1906, na Dinamarca, Oluf Bang, descartou esta possibilidade (Carter, 1988; Silva, 1990). Em 1910, Twort isolou e cultivou o bacilo pela primeira vez, em meios artificiais (Corrêa & Corrêa, 1992).

No Brasil, Dupont, em 1915 observou a paratuberculose em bovinos importados (Silva, 1990). Em 1961, Silva e Pizelli observaram a doença clínica em bovinos da raça Jersey, em Petrópolis-RJ, cultivando posteriormente, o MAP em ovos embrionados. Em 1979, foram relatados dois casos no Estado de Santa Catarina, um caso de bovino importado e outro em bovino nascido no Brasil, em diferentes regiões daquele Estado (Corrêa e Corrêa, 1992).

A preocupação com o desenvolvimento da doença no país tem sido mais freqüente, o que é observado através de um maior número de publicações realizadas sobre os aspectos clínicos e patológicos (Driemeier *et al.*,1999), sobre a detecção da doença através de isolamento da bactéria (Gomes *et al.*,2002b) e testes sorológicos (Ferreira *et al.*,2002a; Ferreira *et al.*,2002b).

2.2. ETIOLOGIA

A paratuberculose ou enterite paratuberculosa ou doença de Johne, como também é conhecida, é causada pelo MAP (Silva, 1990). Antes conhecido apenas como *Mycobacterium paratuberculosis*, porém, a Associação Internacional de Paratuberculose propôs sua reclassificação, como subespécie do *M. avium* passando a ser chamado mundialmente como *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (Collins & Manning, 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 apatogênica, 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; Silva, 1990). 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 (Silva, 1990). É destruído pelos cresóis a 5% em duas horas, pela formalina e o lisol a 5% em 10 minutos (Manual Merck, 1997).

2.3. 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 (Silva, 1990; 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, dispondo 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).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

A doença afeta ruminantes doméstico - bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos - e ruminantes selvagens, como antílopes, camelos e lhamas (Blood *et al.*, 1983). Os bovinos tanto os destinados ao corte quanto ao leite são acometidos (Stehman, 1993), assim como cavalos, suínos, veados e alpaca (Manual, 1996).

Os suínos que vivem em comum com os ruminantes doentes podem apresentar infecção inaparente (Silva,1990), observada pelo aumento dos linfonodos mesentéricos, de onde os microrganismos podem ser isolados (Blood *et al.*, 1983).

A ocorrência independe de sexo, idade, clima ou estação do ano. Os bezerros são mais susceptíveis à infecção, sendo acometidos com poucos meses de vida, vindo a aparecer os sintomas clínicos somente após os dois anos de idade (Corrêa & Corrêa, 1992; Begara-Mc Gorum *et al.*,1998; Jakobsen *et al.*, 2000). Isso se dá devido ao longo período de incubação que decorre aproximadamente dois anos entre a época de contágio e o aparecimento dos primeiros sintomas (Silva, 1990; Begara-Mc Gorum *et al.*,1998; Jakobsen *et al.*, 2000).

A maioria dos animais expostos ao MAP torna-se portador inaparente, sem manifestar a doença clínica, eliminando intermitentemente os microrganismos, em níveis geralmente baixos e, por isso, permanecendo ignorada (Silva, 1990; Stehman, 1993). Os animais portadores excretam os microrganismos nas fezes 15-18 meses antes dos sinais clínicos surgirem (Blood *et al.*, 1983).

Os animais criados em ambientes contaminados podem se tornar disseminadores permanentes ou temporários, sem serem acometidos clinicamente pela doença. (Blood *et al.*, 1983). Os bovinos de corte apresentam menor prevalência de infecção, em comparação ao gado leiteiro, devido à situação de criação mais intensivamente estabulado (Stehman, 1993).

No entanto, estudos realizados na República Tcheca, baseados em exame sorológico e cultura fecal, em gados de corte criados extensivamente e vacas leiteiras confinadas em estábulos, indicaram uma prevalência similar em ambos os grupos (Yayo Ayele *et al.*, 2002).

A introdução da doença em um rebanho se faz geralmente por portadores sub-clinicamente infectados (Manual Merck, 1997), que eliminam o agente em quantidades pequenas e de forma constante, contaminando o ambiente significativamente, disseminando a infecção por todo o rebanho (Stabel, 1998).

A transmissão ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados pelas fezes de animais acometidos (Blood *et al.*, 1983; Seffner, 1988). Assim como, após a difusão no leite (Seffner, 1988). E ainda, da mãe ao vitelo no útero (Lambeth *et al.*, 2002). Há relatos da transmissão pelo leite que alimenta os bezerros (Yayo Ayele *et al.*, 2002) e de que o MAP também pode ser encontrado em leite de vaca, pasteurizado dentro dos padrões internacionais (Klausen *et al.*, 2002).

No sêmen e nas glândulas sexuais acessórias de touros infectados, também foram recuperados microrganismos, no entanto, ainda não se demonstrou a transmissão da doença através destes (Ramos *et al.*, 1986).

A paratuberculose chega a muitos países por meio da importação de lotes de animais de raça pura, porém contaminados (Blood *et al.*, 1983); como exemplo cita-se a Eslovênia. Na qual em 1961 a paratuberculose foi relatada em vacas Jersey importadas e entre os anos de 1997 e 2002 foi observado um crescimento para 11,59% dos rebanhos bovinos portadores da doença (Ocepek *et al.*, 2002).

Na República Tcheca, desde 1990, há uma crescente prevalência da doença desde que passou a importar animais portadores da micobactéria, clinicamente saudáveis. Em estudos realizados foi encontrada 52,5% (53/101) de prevalência no rebanho bovino de corte e 54,7% (52/95) em vacas leiteiras (Yayo Ayele *et al.*, 2002).

A paratuberculose é uma doença de ocorrência mundial (Manual, 1996). Na Europa encontra-se disseminada entre os bovinos (Blood *et al.*, 1983.). Na Bélgica, através de um teste ELISA comercial, foram encontrados animais positivos em 10% de rebanho leiteiro, 11% em um rebanho misto e 3% em um rebanho destinado à carne (Boelaert *et al.*, 2000).

Em Portugal, a doença foi confirmada em 56% nos gados da localidade de Alentejo (Ferreira *et al.*, 2002d).

A enfermidade está difundida entre os rebanhos leiteiros na Dinamarca. Um levantamento sorológico realizado em 900 rebanhos, equivalente a 7,5% de todo o rebanho leiteiro do país, mostrou que 70% das amostras encontravam-se positivas para o teste de ELISA (Nielsen *et al.*, 2000).

Estudos realizados em amostras de leite pasteurizado, no Reino Unido, observaram níveis baixos de paratuberculose. Estudos anteriores, sobre a região Norte-Central da Espanha relataram uma prevalência de infecção sub-clínica de 30% no gado. Recentemente, estudos realizados em toda Espanha, através de técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tanques de leite, indicaram uma prevalência de 47,6% (Sevilla *et al.*, 2002).

Levantamento sobre a doença em tanques de leite em diferentes regiões em Zurique, na Suíça, apresentou uma prevalência de 19,7% nas amostras (Corti & Stephan, 2002).

Na França, a paratuberculose já foi relatada e atualmente, há um intenso trabalho para controlar a enfermidade (Couquet, 2002).

Em fazendas leiteiras no nordeste da Itália foi obtido prevalência de 3,5% de animais acometidos pela doença (Robbi *et al.*, 2002).

Na Noruega, a prevalência é relativamente baixa para a paratuberculose (Nielsen *et al.*, 2000). Assim como na Suécia, porém, os animais infectados são todos provenientes de rebanhos de corte (Sternberg *et al.*, 2002a) e as fazendas leiteiras são consideradas livres da enfermidade (Sternberg *et al.*, 2002b).

Em Missouri, continente americano, 89 rebanhos foram submetidos ao teste de ELISA, sendo que, 74% do rebanho de leite, mostraram-se positivos e 40% do rebanho de carne reagiram positivamente (Thorne & Hardin, 1997). No Texas, foi apresentada uma positividade de 43,5% no gado de corte, com maior prevalência nas regiões Sul e Central (Roussel *et al.*, 2002). Na Califórnia, 1950 amostras sanguíneas, proveniente de rebanhos leiteiros de três regiões geográficas daquele país, através de um kit ELISA comercial, encontraram uma soroprevalência de 6,9% na região norte, 3,7% na região central e 5,2 na região sul da Califórnia (Adaska & Anderson, 2003).

No continente asiático, também há relatos da doença. Em Israel, um estudo realizado em fazendas leiteiras observou uma positividade em diferentes períodos de lactação (Chaffer *et al.*, 2002).

Yokomizo *et al.*, (2002), relatam que no Japão, 1,6% do gado leiteiro e 2,6% do gado de corte está infectado com o MAP. Com uma média anual de 212 casos da doença clínica nos últimos cinco anos (Collins & Manning, 2004).

No continente oceânico, a Austrália é considerada zona livre da doença entre gado, camelídeos, ovelhas e cabras desde outubro de 1999 (Cousins *et al.*, 2002).

Estudo realizado no continente africano foi observado que na República da Tunísia dados de doença apenas em camelos. Na República de Zâmbia a paratuberculose é relatada como sendo um problema maior nas ovelhas que nos bovinos. E na África do Sul, a doença tem sido relatada em ovelhas e gados com focos isolados em rebanhos na região úmida (Collins & Manning, 2004).

A paratuberculose também está presente na América do Sul. No Uruguai, em sua região leiteira mais importante, foi observada uma elevada propagação da doença entre os rebanhos bovinos (Piaggio *et al.*, 2002).

Na Argentina, entre os anos de 1992 e 2002, através do teste de ELISA indireto, foi observado em bovinos, cervos e ovinos, uma prevalência de 26,5% de animais portadores na produção de carne e 56% dos animais para produção de leite em Buenos Aires, 7% em Rio Negro, 2,4% em La Pampa, 1% em Corrientes, 0,2% em La Rioja e 0% em Neuquém, demonstrando uma importante prevalência da paratuberculose neste país (Paolicchi *et al.*, 2002).

Em um outro estudo realizado na Argentina em 2003, através de diferentes métodos diagnósticos, utilizando 24 vacas selecionadas aleatoriamente, todas sem sinais clínicos da doença, provenientes de um rebanho com histórico de presença da enfermidade, foi constatado 41,6% dos animais positivos para teste de ELISA, com isolamento de grupos de MAP no leite de dois animais e nas fezes de seis animais, dos quais, cinco foram positivos para o ELISA (Paolicchi *et al.*, 2003).

No Brasil, a entrada da doença foi relacionada à importação de bovinos infectados. Tendo relatos de diagnóstico em bovinos importados e também em bovinos nascidos no país, filhos de pais importados (Silva, 1990).

Não há nenhuma estimativa de prevalência da doença no país inteiro. No entanto, há seis descrições na Região Sudeste - Rio de Janeiro e Minas Gerais e duas, na Região Sul - Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Driemier *et al.*, 1999).

Recentemente, na Região Sul do país, especificamente no Estado do Rio Grande do Sul, a enfermidade foi detectada através de um teste ELISA, em 39,4% dos bovinos estudados (Gomes *et al.*, 2002a). Em um outro estudo na mesma região, em um rebanho infectado, no qual a maioria das vacas foram importadas da Argentina, a micobactéria foi isolada de amostras intestinais e linfonodos de oito vacas leiteiras, no qual 11,4% (26/228) foram positivas para o teste de Teste de Imunodifusão em Agar Gel e 39,8% (125/314) das amostras

mostraram-se positivas e 14,9% (47/314) mostraram-se suspeitas em um teste ELISA comercial (Gomes *et al.*, 2002b).

No Estado do Rio de Janeiro, através de um kit ELISA comercial, 18% dos animais mostraram-se positivos para a paratuberculose, (Ferreira *et al.*, 2002b). E, posteriormente, em outro estudo, utilizando 179 soros de vacas leiteiras nascidas no Rio de Janeiro, 103 mostraram-se positivas em um ELISA comercial, sugerindo assim, a presença do agente entre os rebanhos brasileiros (Ferrerira *et al.*, 2002c).

Em países desenvolvidos com grande produção leiteira a doença é uma barreira para a venda do gado no mercado de exportação (Wraight *et al.*, 2000).

Alguns autores apontam o MAP como o agente envolvido na ileocolite granulomatosa de humanos, conhecida também como, Doença de Crohn (Chiodini *et al.*, 1986). Estudos de hibridização do DNA demonstraram íntima homologia com o *M. avium spp* e possível relação com isolados micobacterianos de alguns casos de moléstia de Crohn em seres humanos (Stehman, 1993; Jones *et al.*, 2000).

2.5. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos são observados somente nos animais adultos. Nas fêmeas, geralmente, entre o segundo ou terceiro parto (Ramos *et al.*, 1986). Fatores de estresse como o parto, parasitose intensa, grande produção leiteira, e má nutrição, podem precipitar o surgimento da doença (Corrêa & Corrêa, 1992; Stehman, 1993). O curso clínico geralmente se prolonga, por três meses, ou mais (Manual, 1996).

Classicamente, a paratuberculose, provoca uma diarreia crônica ou intermitente, de coloração esverdeada, de consistência homogênea, sem sangue, fibrina, fragmentos de tecido epitelial, muco, odor incomum ou dor abdominal (Blood *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1986; Driemeier *et al.*, 1999). Tende a melhorar na gravidez avançada, para reaparecer de forma grave logo após o parto (Blood *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1986; Manual Merck, 1997).

Inicialmente, os animais afetados têm bom apetite e sinais vitais normais (Silva, 1990). Porém, é perceptível uma pequena diminuição da produção de leite. No estágio avançado da doença, quando a diarreia já se mostra severa, a produção leiteira não atinge os níveis esperados, há também, edema ventral e intermandibular devido a uma hipoproteïnemia, perda de peso e subdesenvolvimento, a pelagem mostra-se sem brilho, alopecica e ressecada (Blood *et al.*, 1983; Silva, 1990; Stehman, 1993; Manual Merck, 1997; Driemeier *et al.*, 1999).

Finalmente, há anorexia, desidratação, debilidade e em alguns casos, morte (Stehman, 1993; Manual Merck, 1997).

Devido ao balanço energético negativo, há diminuição do crescimento e desenvolvimento do corpo lúteo, alterando a reprodução (Johnson-Ifearulund *et al.*, 2000).

Salmonelose, parasitoses gastrointestinais e deficiência secundária de cobre, devido ao excesso de molibdênio, diarreia viral bovina crônica e amiloidose renal devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da doença (Stehman, 1993; Driemeier *et al.*, 1999).

2.6. 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 (Silva, 1990). 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; Silva, 1990; 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).

2.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico pode ser realizado através da sintomatologia clínica, associada aos dados epidemiológicos, que sugerem a existência de paratuberculose no rebanho (Gomes, *et al* 2002b).

No entanto, o diagnóstico laboratorial da paratuberculose tem sido a principal ferramenta para elucidar os casos suspeitos. Porém, a demonstração do agente em grandes quantidades nos esfregaços, no material de biópsia e de raspado de mucosa é necessário. Por isso, atualmente, há um desenvolvimento progressivo de testes sorológicos e moleculares a fim de facilitar e agilizar o diagnóstico da paratuberculose (Jones *et al.*, 2000).

Didaticamente neste texto os métodos diagnósticos estão divididos em métodos diretos e indiretos.

2.7.1. Método Direto

É o método de detecção do agente que inclui a baciloscopia, cultura, exame histológico do tecido alvo, intestino delgado e linfonodos mesentéricos, além de provas genéticas (Buergelt & Ginn, 2000).

A baciloscopia consiste na visualização microscópica de bactérias provenientes de preparações finas de fezes ou fragmentos da mucosa retal ou intestinal, preferencialmente o íleo, e linfonodos mesentéricos do animal morto e da mucosa retal do animal vivo, corada pela técnica de Ziehl-Neelsen. O bacilo da paratuberculose é encontrado em tamanho menor que as formas saprófitas e em forma de grumos (Silva, 1990; Manual, 1996).

A cultura bacteriana apresenta-se como um teste mais sensível durante os estágios clínicos. Porém, o tempo necessário para o isolamento do agente, pode variar de 4 a 16 semanas (Stehman, 1993). É realizada em meio de Herrold contendo micobactina, observando colônias muito pequenas, incolores, translúcidas e hemisféricas com suas margens arredondadas (Manual, 1996).

As culturas da biópsia de linfonodos mesentéricos ou ileocecais são testes sensíveis para o diagnóstico da paratuberculose clínica e sub-clínica (Carter, 1988; Manual Merck, 1997; Benedictus *et al.*, 2000). A cultura de fezes é o teste menos sensível, devido aos erros de amostragem relacionados à seleção dos espécimes, e dos transtornos do processamento (Stehman, 1993). Suas desvantagens estão relacionadas à eliminação intermitentemente do agente pelos animais infectados, o hipercrescimento de culturas com contaminantes, o tempo necessário para o isolamento do agente (Stehman, 1993). E a presença de germes ácido-resistentes saprófitos nas fezes (Silva, 1990).

Recentes desenvolvimentos nos testes diagnósticos envolvem o uso da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, um teste relativamente rápido, quando comparado com os métodos tradicionais de cultura e oferece especificidade elevada tanto nos estágios clínicos e sub-clínicos (Gasteinner *et al.*, 2000).

Para a detecção da paratuberculose, atualmente, tem-se usado a seqüência de inserção IS900, esta seqüência é específica para *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*. (Collins *et al.*, 2003). No entanto, o alto nível de especificidade é prejudicado devido a problemas encontrados durante a preparação das amostras, como a extração da micobactéria da amostra, particularmente quando esta é encontrada em pequena quantidade (European Commission, 2000).

2.7.2. Método indireto:

O método indireto é o método de detecção de imunidade, conferida pelos anticorpos específicos no soro sanguíneo/células imuno-mediadas. (Burgelt & Ginn, 2000), desenvolvidos durante a infecção, como resposta relacionada ao estágio da doença e o tipo de lesão observada (Harris & Barletta, 2001).

2.7.2.1. Testes sorológicos

Os testes sorológicos permitem estudar uma grande quantidade de animais em um período curto de tempo, tornando-se importantes em programas de controle devido sua praticidade (European Commission, 2000; Dargatz *et al.*, 2002).

Os testes mais comumente usados para diagnóstico da paratuberculose são: o teste de Fixação do Complemento (FC), o teste de Imunodifusão em Ágar Gel (IDAG), o teste de dosagem de Gama Interferon (γ IFN) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Manual, 1996; Van Maanen *et al.*, 2002).

a) Teste de Fixação do Complemento (FC)

O teste de FC foi o teste padrão usado para bovinos por muitos anos. Era bastante utilizado nas suspeitas clínicas, possui baixa sensibilidade e especificidade sendo descritas reações cruzadas com outras espécies bacterianas (Gomes, 2002). Por isso, não é indicado para uso em rebanhos para o controle da doença (Manual, 1996). Porém, na Europa, ainda é bastante usado em animais para importação e exportação de bovinos (European Commission, 2000).

b) Teste de Imunodifusão em Agar Gel (IDAG)

Este teste baseia-se na visualização da precipitação do complexo antígeno-anticorpo em uma placa de gel de Agar. É uma técnica rápida. Porém, seu uso foi desaconselhado por apresentar baixa sensibilidade e especificidade (Riemann & Abbas, 1983; Chiodini *et al.*, 1986). Sendo usado atualmente, apenas como método confirmatório apenas para os animais clinicamente suspeitos (Ferreira *et al.*, 2002a).

c) Teste de dosagem de Gama interferon (?IFN)

O teste de dosagem de Gama-interferon está baseado na detecção de uma citocina solúvel no plasma, o interferon gama, que é liberado de linfócitos T sensibilizados como resposta a um antígeno específico (Wood *et al.*, 1989 *apud* Gomes, 2002). A estimulação de linfócitos é realizada através da Proteína Purificada Derivada Aviária (PPD), para detectar animais com infecção sub-clínica (Manual, 1996). Pode ser usado para diagnosticar estágio precoce da doença, juntamente com o teste de ELISA e cultura bacteriológica (Paolicchi *et al.*, 2003).

d) Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

No ELISA indireto, são usadas placas plásticas sensibilizadas com o antígeno que, após bloqueio, reagem com os anticorpos da amostra teste. O complexo antígeno-anticorpo é revelado por um segundo anticorpo, o conjugado anti-imunoglobulina, ligado a uma enzima que catalisa a reação que é medida pelo espectrofotômetro (Sanchez, 1996; Gomes, 2002).

Atualmente, o ELISA, é visto como teste sorológico de eleição para o diagnóstico da paratuberculose, pela conveniência da coleção de amostras, procedimento laboratorial rápido e baixo custo, principalmente, para analisar rebanhos (European Commission, 2000; Buergelt & Ginn, 2000; Van Maanen *et al.*, 2002). Por apresentar sensibilidade e especificidade elevadas para a identificação de anticorpos sangüíneos anti- *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*. É capaz de detectar a doença sub-clínica (Michel & Bastianello, 2000). O que tem proporcionado o uso em animais a partir de dois anos de idade apresentando bons resultados (European Commission, 2000).

Porém, o estágio da doença pode afetar o resultado do teste, com melhor desempenho do teste observado nos animais que mostram sinais clínicos e eliminação intensa de microrganismo, ou seja, no estágio clínico da doença (Gasteiner *et al.*, 2000; Whitlock *et al.*, 2000; Paolicchi *et al.*, 2003).

A especificidade se torna elevada pela absorção do soro com outra micobactéria, a *Mycobacterium phlei*, o que remove os anticorpos não-específicos, evitando assim, as reações cruzadas contra os antígenos do MAP (European Commission, 2000).

Os testes comerciais que incorporam antígenos mais específicos a MAP proporcionam uma sensibilidade de detecção entre 70 a 80% e uma especificidade entre 89 a 95% (Stabel, 1998). Existem diversos testes de ELISA no comércio, tanto para a detecção de anticorpos em amostras de sangue, como em amostras de leite. Este último mostra-se bastante prático devido à conveniência e facilidade de coleta (Klausen *et al.*, 2002).

O que se observa atualmente é o uso comum do teste de ELISA conjuntamente com outros métodos diagnósticos tais como a cultura fecal (Stabel, 1998).

2.7.2.2. Teste de hipersensibilidade

O teste alérgico, intradérmico, é realizado através de produtos micobacterianos como os Derivados Protéicos Purificados (“Purified Protein Derivative”- PPD), tuberculina aviária ou a jonina (extrato de MAP). É um teste de sensibilidade, em que os animais infectados com o MAP produzem uma resposta imune do tipo celular quando entram em contato com os produtos microbianos - PPD, tuberculina aviária e jonina (Stehman, 1993).

A dose inoculada é de 0,2 ml na pele do pescoço, com a leitura sendo realizada 48 horas após a inoculação. A reação é positiva quando apresenta uma tumefação quente e dolorosa com espessamento superior a 3mm, medida pelo paquímetro ou cutímetro, duvidosa quando encontra-se entre 2 e 3 mm e negativa com menos de 2 mm (Silva, 1990). A melhor visualização da reação local é indicada na região cervical comparada à região da dobra da cauda (Antognoli *et al.*, 2002).

Este teste não se mostra útil por ocorrerem com frequência resultados falso-positivos e falso-negativos (Stehman, 1993). Devido à reação antigênica cruzada ocasionada pela presença de micobactérias presentes no meio ambiente (Harris & Barletta, 2001).

2.8. CONTROLE E PROFILAXIA

Não há tratamento específico para a paratuberculose (Silva, 1990). Mesmo em animais tratados com antibióticos, a doença mostra-se refratária ao tratamento (Driemer *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 controle e a erradicação da paratuberculose dependem da execução das práticas que limitam o risco da transmissão da doença, como um bom manejo (Manual Merck, 1997; Wraight *et al.*, 2000). Além do que, devem ser adotadas medidas preventivas, como testes diagnósticos, limitação do movimento animal entre as fazendas e vacinação (Benedictus *et al.*, 2000). A vacina, evita a doença clínica, mas não previne a infecção (Manual, 1996; Benedictus *et al.*, 2000).

Mundialmente, as medidas de controle são baseadas em abate dos animais positivos (Manual Merck, 1997), separação da mãe imediatamente após o nascimento dos filhos 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.*, 2002b). 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).

Os cochos devem ficar em posições altas, assim como, evitar que a pastagem seja feita em capim muito curto, além do fechamento do pasto contaminado por um período de três anos (Sternberg *et al.*, 2002b).

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

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Diagnosticar a paratuberculose em bovinos de corte procedentes de criatórios do Estado do Pará.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar um kit ELISA comercial para a detecção de aglutininas anti- *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* em bovinos de corte;
- Determinar o índice de soropositividade dos animais de acordo com a mesorregião, o sexo e a idade;
- Identificar o *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, através da baciloscopia com coloração de Ziehl-Neelsen.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS:

Os animais em estudo eram todos de aptidão para corte, provenientes de 23 municípios (figura 1), de cinco mesorregiões do Estado do Pará (tabela 1), destinados ao abate em um matadouro da Região Metropolitana de Belém, Estado do Pará.

Foram utilizadas 514 amostras de sangue bovino de rebanho de corte, machos e fêmeas (tabela 2), sem distinção de raça, classificados em dois grupos, de acordo com a idade, menores ou iguais a 36 meses e maiores de 36 meses (tabela 3). Todas as amostras foram colhidas aleatoriamente.

Dentre os 514 animais, foram escolhidos, aleatoriamente, 100 animais para a realização do exame de baciloscopia de órgãos, coletando amostras de intestino delgado e linfonodo mesentérico correspondente.

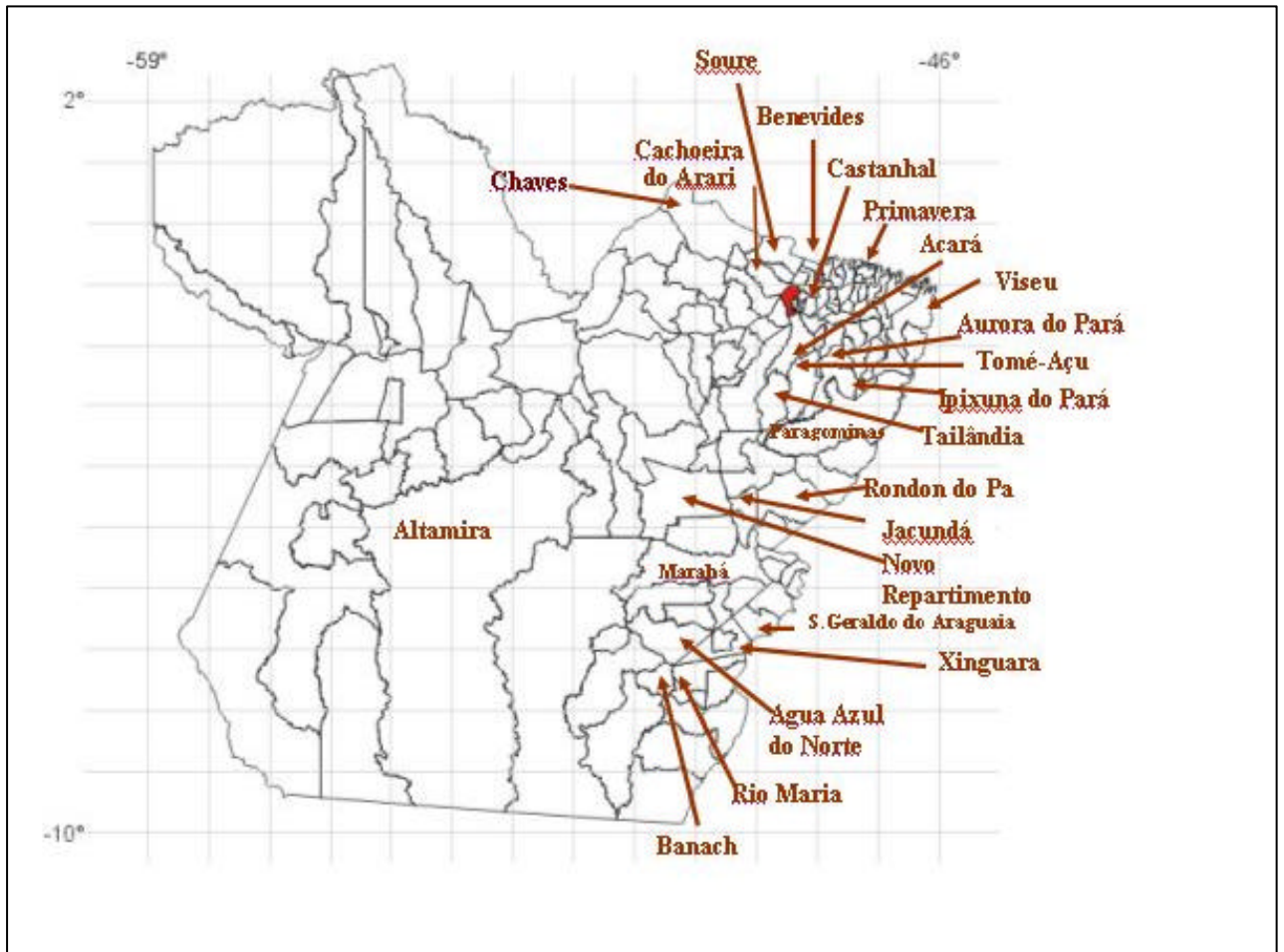


Figura 1- Mapa representativo, demonstrando os municípios onde foram colhidas as amostras no Estado do Pará, Brasil.

Tabela 1 - Mesorregiões do Estado do Pará de onde originaram as amostras colhidas.

MESORREGIÕES GEOGRÁFICAS DO PARÁ	TOTAL	%
MARAJÓ	34	6,62
METROPOLITANA DE BELÉM	34	6,61
NORDESTE PARAENSE	73	14,20
SUDESTE PARAENSE	330	64,20
SUDOESTE PARAENSE	43	8,37
TOTAL	514	100

Tabela 2 – Distribuição das amostras de acordo com o sexo dos animais em estudo.

SEXO	N. ANIMAIS	%
Fêmeas	312	60,70
Machos	202	39,30
TOTAL	514	100

Tabela 3 – Distribuição das amostras de acordo com a idade dos animais em estudo.

IDADE	N. ANIMAIS	%
= 36 meses	184	35,80
> 36 meses	330	64,20
TOTAL	514	100

4.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

✓ SANGUE

Foram colhidos de cada animal, 15 ml de sangue da veia jugular, os quais foram acondicionados em tubos de vidro esterilizados, sem anticoagulante, para a obtenção e conservação do soro a -20°C no Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades de Animais (LIDEA), da Universidade Federal do Pará (UFPA), até a realização da análise.

✓ LINFONODOS MESENTÉRICOS E FRAGMENTOS DE INTESTINO DELGADO

Fragmentos de aproximadamente 5cm de comprimento, foram retirados do intestino delgado, da região próxima ao íleo, e de linfonodos mesentéricos regionais. Colhidos na linha de abate e lavados em solução fisiológica, a fim de ser retirado o excesso de conteúdo intestinal. Em seguida foram embalados em saco plástico, mantido em isopor com gelo para transporte até ao laboratório (LIDEA/UFPA), para realização da baciloscopia.

4.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO:

Foram utilizadas técnicas diretas e indiretas para o diagnóstico da Paratuberculose, baciloscopia e Teste de ELISA, respectivamente.

4.3.1. ELISA indireto

Foram testadas 514 amostras de sangue bovino através do ELISA indireto, a fim de detectar anticorpos anti-*Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*. Foi utilizado um kit comercial: “Paratuberculosis ELISA -Para-TB-Ab” (SVANOVA, Suécia). O teste foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

As microplacas foram sensibilizadas pelo fabricante com o antígeno de MAP. Os soros-controles e amostras testes foram diluídos 1:100 em PBS-Tween (PBST). Foram adicionados, em duplicatas, 100µL de soro controle em lugares específicos da placa e 100µL de soros testes em cada poço da placa sensibilizada, incubadas por 30 minutos a 25°C e em seguida, lavada por três vezes com PBST e posteriormente seca. Foram adicionados 100µL de conjugado anti-IgG1 bovino (peroxidase horseredish-HRP- conjugado monoclonal) em cada poço, incubada a 25°C por 30 minutos, lavada 3 vezes com PBST e seca. Posteriormente foi adicionada 100µL da solução substrato tetrametilbenzidine em cada poço, para dar cor a reação. Incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. E finalmente, foi utilizado 50µL da solução bloqueadora (ácido sulfúrico 2M) da reação enzimática em cada poço e posterior leitura espectrofotométrica, utilizando leitora de ELISA com filtro de 450nm.

A amostra foi considerada positiva quando a relação entre as médias dos dois valores obtidos pelas densidades ópticas (DO) da amostras testada x 100, dividida pela média dos dois valores de DO dos controles positivos foi igual ou superior 53. O teste foi considerado suspeito quando obteve um índice ELISA entre 32 a 52 e negativo quando o valor for menor que 31.

4.3.2. Baciloscopia

Dos 100 animais destacados aleatoriamente no grande grupo de 514 animais, foram coletadas amostras de intestino delgado e linfonodos mesentéricos. Foram realizados raspados de mucosa, fixados em lâminas e coradas através da técnica de Ziehl-Neelsen, para a visualização de bastonete álcool-ácido-resistentes agrupados corados em vermelho-rosado.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras classificadas, segundo a mesorregião, sexo e idade, foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste de Qui-quadrado (χ^2), com a finalidade de verificar se houve associação significativa entre a frequência de soro-positivo e soro-negativo, em cada uma das classes acima citadas. Todas as análises foram feitas através do programa Statistical Analysis System (SAS).

5. RESULTADOS

Os resultados do teste de ELISA indireto estão exibidos na Tabela 4. Dentre as 514 amostras de soro provenientes de cinco mesorregiões do Estado do Pará, 182 amostras apresentaram anticorpos anti-MAP, reagindo positivamente ao teste ELISA indireto, representando 35,4% de prevalência e 332 amostras não reagiram ao teste, representando 64,6% de animais não reagentes.

Tabela 4- Resultado do teste de ELISA indireto para identificação de anticorpos anti-MAP de acordo com a mesorregião, Estado do Pará, 2005.

MESORREGIÃO	NEGATIVO	%	POSITIVO	%	TOTAL
Marajó	22	6,63	12	6,59	34
Metropolitana de Belém	27	8,13	7	3,85	34
Nordeste paraense	54	16,27	19	10,44	73
Sudeste paraense	206	62,05	124	68,13	330
Sudoeste paraense	23	6,93	20	10,99	43
TOTAL	332	64,60	182	35,40	514
$\chi^2 = 0,05$	$P = 0,01$				

Foi observado ainda, que na mesorregião sudeste do Estado foi encontrado o maior índice de animais soropositivos (68,13%), e na mesorregião Metropolitana de Belém, o menor índice com 3,85% de animais soro-positivos. Porém, estatisticamente, entre todas as mesorregiões amostradas não foi verificada associação significativa entre a presença de anticorpos anti-MAP e as mesorregiões estudadas ($P > 0,05$). O que indica igual probabilidade

de ocorrência da doença em qualquer um das mesorregiões estudadas, já que as incidências entre as mesorregiões foram iguais.

Como não houve associação significativa, estatisticamente, entre as mesorregiões. Fez-se necessária análise de resultados obtidos entre as classes de idade e sexo.

A frequência de animais soro-positivos e soro-negativos, avaliados de acordo com a faixa etária pode ser observada na tabela 5. Houve associação significativa entre a faixa etária dos animais com a ocorrência de soro-positivos ($P < 0,01$). Entre os animais com idade inferior ou igual a 36 meses, 28,80% foram soro reagentes enquanto que 71,20% não se encontraram reagentes ao agente da paratuberculose. Entre os animais com idade superior a 36 meses foi observada uma diminuição dos animais não reagentes para 60,91% e uma elevação dos soros reagentes para 39,09%, demonstrando o aumento da resposta ao agente com o avanço da idade.

Tabela 5- Resultado do teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-MAP segundo a faixa etária dos animais.

IDADE	NEGATIVO	%	POSITIVO	%	TOTAL
= 36 meses	131	71,20	53	28,80	184
> 36 meses	201	60,91	129	39,09	330
TOTAL	332	64,59	182	35,41	514
$\chi^2 = 0,05$	$P = 0,01$				

Nas amostras examinadas de acordo com o sexo, foi verificada associação significativa da ocorrência de soros positivos em relação ao sexo dos animais. Notou-se um elevado número de animais soro-reagente entre as fêmeas, que apresentaram uma prevalência de 40,38% enquanto que entre os machos foi apresentado, somente, 27,72% de prevalência (Tabela 6). Observando assim, que as fêmeas tendem a apresentar uma maior prevalência em relação aos machos.

Tabela 6- Resultado da prevalência de animais soro-positivos e soro-negativos, de acordo com o sexo do animal, obtidos através do teste de ELISA indireto.

SEXO	NEGATIVO	%	POSITIVO	%	TOTAL
Fêmeas	186	59,62	126	40,38	312
Machos	146	72,28	56	27,72	202
TOTAL	332		182		514
$\chi^2 = 0,05$	$P = 0,003$				

A partir desses resultados, se faz necessário a observação da relação idade e sexo. A presença de anticorpo anti-MAP entre as fêmeas em todas as idades estudadas é exibida na Figura 2. Entre as fêmeas soro-negativas, 21,51% apresentavam-se no grupo de faixa etária menor ou igual a 36 meses e 78,49% pertenciam ao grupo com faixa etária superior a 36 meses. Entre as fêmeas soro-positivas, 7,94% estavam no grupo das que possuíam idade igual ou inferior a 36 meses e 92,06% possuíam faixa etária superior a 36 meses. Observou-se um

aumento progressivo da resposta de anticorpos nas fêmeas mais velhas, a qual foi confirmada pelo teste de X^2 .

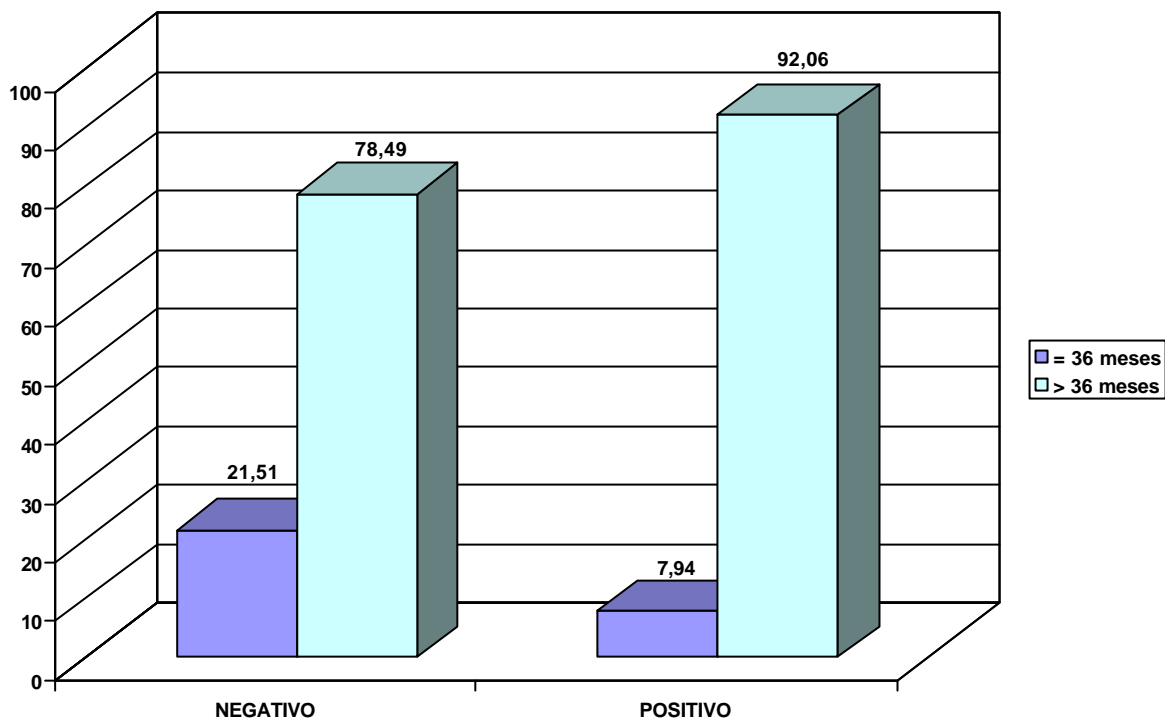


Figura 2- Teste ELISA indireto realizado nas fêmeas entre os grupos de idade estudados, a fim de detectar anticorpos anti-MAP.

Os resultados demonstram um aumento da proporção de soro-positivos entre as fêmeas mais velhas, independente do município ou mesorregião.

Quanto aos machos, a resposta sorológica ao teste de ELISA, para a verificação de anticorpos anti-MAP é exibida na figura 3.

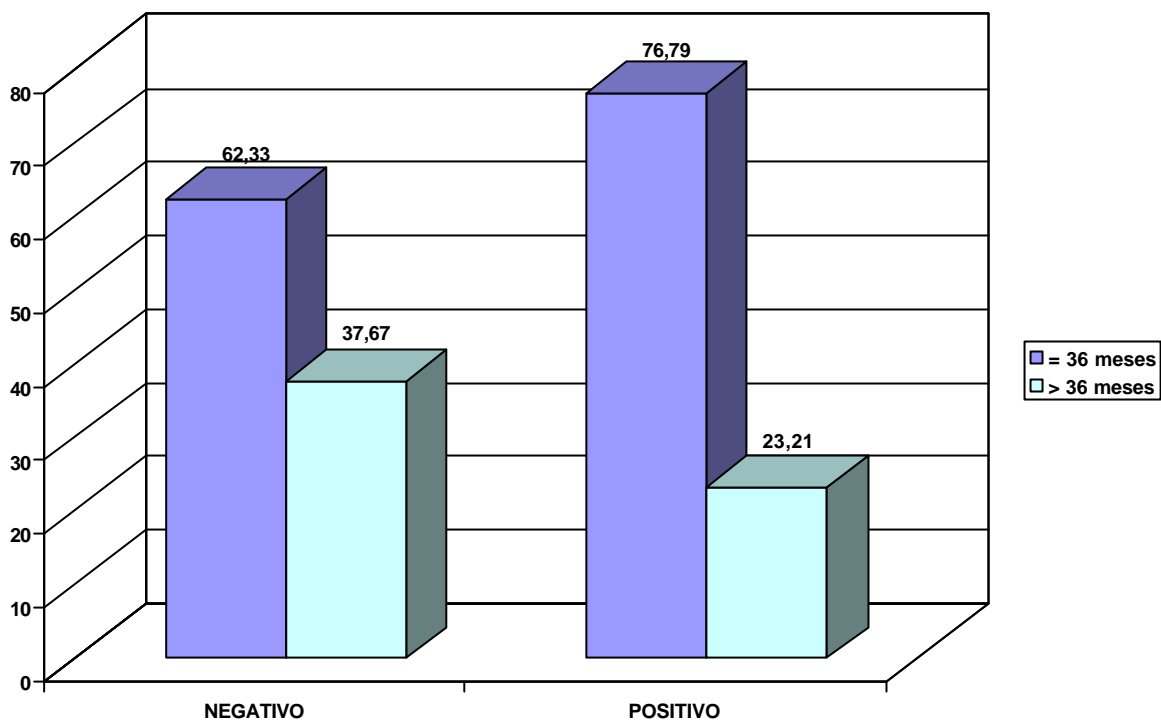


Figura 3 – Resposta ao Teste de ELISA indireto, para detecção de anticorpos anti-MAP, realizado nos machos em relação a idade.

Relacionando os animais machos soro-positivos e negativos com a faixa etária, verificou-se que não houve associação significativa entre a presença do anticorpo em relação à faixa etária nos machos. Entre os animais soro-negativos foi encontrado um índice de 62,33% nos machos com faixa etária inferior ou igual a 36 meses e 37,67% nos machos com idade superior a 36 meses. Entre os soro-positivos, foi encontrado um índice de 76,79% entre os machos com idade inferior ou igual a 36 meses e 23,21% nos machos com idade superior a 36 meses. Diminuindo a resposta ao teste ELISA a medida que a faixa etária aumentou.

Entre as cem amostras preparadas para baciloscopia, o MAP não foi identificado em nenhuma delas, através do método de Ziehl-Neelsen, considerando a característica morfológica do microrganismo.

Porém, foram encontradas várias outras formas bacterianas nas amostras de intestino delgado e de linfonodo. Entre elas, os cocos foram encontrados com maior frequência em ambos os tecidos, estando presentes em 29 amostras de fragmento de intestino delgado e em 10 amostras de linfonodo.

Duas lâminas de linfonodo apresentaram apenas um único bacilo, curto e grosso. Como o MAP, apresenta-se sempre agrupado não se pôde afirmar que seria o próprio agente ali presente. Além, de nesse estudo não ter sido utilizado a cultura bacteriana, apenas morfologia.

Em 53 lâminas de intestino delgado e 84 lâminas de linfonodo, nenhuma forma bacteriana foi encontrada.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do teste de ELISA mostraram que todas as mesorregiões estudadas no Estado do Pará apresentaram animais com anticorpos anti-*Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, no total de 35%. Esta elevada prevalência encontrada surpreende, quando se observa o aspecto físico dos animais abatidos e a ausência de relatos de casos clínicos sugestivos de paratuberculose no Estado do Pará e na Região Norte.

No entanto, tais resultados assemelham-se aos encontrados em pesquisas, realizadas em localidades onde a ocorrência da doença é conhecida ou onde existe um ou mais animais apresentando sintomatologia clínica sugestiva de paratuberculose. Como os encontrados por Gomes *et al.*(2002b) em um rebanho com sinais clínicos sugestivos da doença, no Rio Grande do Sul, com 39,8% de soropositivos através de um teste ELISA. Assim como, Ferreira *et al.*(2002d) no Rio de Janeiro, encontraram 43% dos animais soropositivos no teste ELISA em rebanho leiteiro. Paolichi *et al.*(2003), na Argentina, que determinaram 41,6% de prevalência em animais leiteiros. Em Missouri, Estados Unidos, Thorne e Hardin (1997), chegaram a uma prevalência de 74% em rebanho leiteiro, 40% em rebanho de corte.

Como se sabe, a paratuberculose causa prejuízos econômicos graves em rebanhos leiteiros, sendo encontrado dessa forma, um maior número de pesquisas direcionadas a animais com esta aptidão. Conseqüentemente poucos trabalhos são realizados em animais de aptidão para corte, porém observa-se prevalência semelhante aos bovinos leiteiros. Roussel *et al.*(2002) encontraram resultados semelhantes aos citados neste estudo, 43,5% de animais de corte soropositivos ao teste de ELISA, em Texas, nos Estados Unidos. Porém, entre os bovinos de aptidão para corte a prevalência também é elevada e, em alguns países, superior aos resultados aqui encontrados. Na Dinamarca e na República Tcheca, por exemplo, foram

encontrados, 70% de prevalência no rebanho nacional (Nielsen *et al.*, 2000) e 52,5% em rebanho de corte (Yayo Ayele *et al.*, 2002), respectivamente.

Devido ao desenvolvimento de pesquisas e aplicações de programas de controle e erradicação da paratuberculose, é possível encontrar índices menores que os aqui encontrados. Como por exemplo, na Bélgica, que apresenta 3% de prevalência em rebanho de carne e 11% em rebanho misto, carne e leite (Boelaert *et al.*, 2000) e no Japão com 2,6% de prevalência em rebanho de gado de corte (Yokomizo *et al.*, 2002).

A alta prevalência encontrada neste estudo pode ser atribuída a vários fatores como o tipo de manejo sanitário e de rebanho utilizado em cada propriedade ou mesorregião do Estado, a ausência de medidas profiláticas contra a paratuberculose, o estresse sofrido pelos animais seja pelo parto ou transporte, acelerando as respostas imunológicas, fato que é bem observado no teste de ELISA.

O clima da região também é um fator importante, pois, apresenta uma característica particular, apenas duas estações, uma de chuvas e outra sem chuvas, ou com poucas chuvas. O que eleva o índice pluviométrico e a umidade da região proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento do MAP. Como relataram Schroen *et al.* (2002), ao compararem o desenvolvimento deste agente em solos secos e molhados, constatando um melhor desenvolvimento da micobactéria naqueles ambientes que mantinham água permanente ou com drenagem pobre do terreno, solo úmido ou alagado.

Em algumas das mesorregiões estudadas, como a do Marajó, há um longo período de alagamento e presença de chuvas constantes em determinadas épocas do ano, que, juntamente com o pisoteamento intenso dos animais proporciona a formação de pequenos lagos. Fato que facilita, segundo Stabel (1998), a disseminação da doença, mesmo com apenas um portador eliminando intermitente o agente.

Em relação ao sexo dos animais estudados, os machos apresentaram prevalência bem menor (27,72%) em relação às fêmeas (40,38%). Dentre estas, as vacas mais velhas, mostraram um índice de soropositividade mais elevado (92,06%). O que pode ser atribuído ao estresse devido a períodos de partos e má nutrição (Corrêa & Corrêa, 1992). De acordo com Ramos *et al.*(1986) quando afirmam que nas fêmeas a manifestação da doença ocorre entre o segundo e o terceiro parto, isto é, nas vacas acima de 36 meses.

Comparando os dados da literatura com os encontrados neste estudo, é importante salientar que as pesquisas envolvem, na maioria, animais de produção leiteira, cujo manejo difere daquele da produção de corte que, nesta região é feita em sistema semi-extensivo, contrapondo-se ao sistema intensivamente estabelecido que ocorre na produção de gado de leite, em grandes centros, em que os animais passam longos períodos em contato uns com os outros (Stehman,1993). Os resultados assemelharam-se aos de Thorne e Hardin (1997), que encontraram 40% de animais soropositivos em animais de rebanho de corte. Porém, este trabalho apontou índices menores que os encontrados por Yayo Ayele *et al.* (2002) na República Tcheca, os quais foram de 54,7% e por Ferreira *et al.*(2002a) em rebanhos leiteiros no Rio de Janeiro, que encontraram 57,54% de soro-reagentes em rebanhos leiteiros. Corroborando os resultados dessa pesquisa Stehman (1993), afirma que bovinos de corte apresentam menor prevalência de infecção em comparação ao gado leiteiro.

Quanto à idade, os animais mais velhos com idade superior a 36 meses, apresentaram soroprevalência maior (39,09%) em relação aos animais mais novos, com idade inferior a 36 meses (28,80%), assim como Gomes *et al* (2002b), quando encontraram um número maior de animais soropositivos nos animais mais velhos. Corroborando com Whitlock *et al.*(2000) quando afirma que a especificidade do teste ELISA aumenta com o avanço do estágio da doença, o que poderia está acontecendo com estes animais caso fossem portadores inaparentes da doença.

Na baciloscopia, a ausência de *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* nas lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, não exclui a ausência da doença na região. O diagnóstico depende da presença de grupos de bactéria álcool-ácido-resistentes. Sua sensibilidade diminui nos estágios precoces da doença e na fase sub-clínica, devido a quantidades raras de micobactérias liberadas pelo animal (Buerelt & Ginn, 2000). E tem a sensibilidade aumentada, à medida que o estágio clínico avança (European Commission, 2000). Por isso, o encontro do MAP nestas amostras apresenta um indício seguro da doença, porém, a ausência deste bacilo nada significa (Silva, 1990).

Assim também observado por Paolicchi *et al.* (2003), que trabalhando com vacas provenientes de rebanhos com histórico da doença, na Argentina, utilizaram vários métodos de diagnóstico, como cultura positiva das fezes, porém nem todas as amostras correspondentes coradas pelo método de Ziehl-Neelsen demonstraram a presença do agente. Isso mostra que os resultados da coloração podem ser sugestivos de que o exame direto da impressão do órgão é um teste não específico.

Nesta pesquisa as amostras eram provenientes de animais aparentemente saudáveis, no que diz respeito a paratuberculose. No entanto, o teste comercial de ELISA, indicou que a soroprevalência da paratuberculose no Pará apresenta um contraste surpreendente, pois foi encontrado um elevado índice de animais com resposta imunológica ao agente, sem que fossem observados casos clínicos sugestivos da mesma em todas as mesorregiões, o que pode estar presente na região porém, ainda não diagnosticada.

Torna-se necessário, então, a realização de exames mais detalhados sobre a paratuberculose, utilizando-se outros testes de diagnóstico como a cultura e isolamento. Com a padronização dos componentes e emprego de antígenos de animais comprovadamente positivos e negativos da região com resultados condizentes com a realidade epidemiológica da

região, o que pode impor providências e medidas de controle a fim de evitar a proliferação da doença entre os rebanhos regionais.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A prevalência da paratuberculose no Estado do Pará foi moderadamente alta.
- ✓ A paratuberculose encontra-se difundida no Estado do Pará, apresentando igual risco da presença da mesma em todas as mesorregiões estudadas.
- ✓ As fêmeas apresentaram maior prevalência que os machos, com os índices de soropositividade maior com o avanço da idade
- ✓ O método de baciloscopia deve ser utilizado em conjunto com outros testes mais sensíveis e específicos

8. REFERÊNCIAS

ADASKA, J.M.; ANDERSON, R.J. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. **Preventive Veterinary Medicine** .v.60, p.255-261, 2003.

ANTOGNOLI, M. C.; SALMAN, M. D.; GOODELL, G.; HIRST, H.; HYATT, D.; MARTIN, B. M. Diagnosis of Paratuberculosis (PTB) in young cattle: Evaluation of humoral and cellular immunity in a heifer cohort during the first 8 months of age. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 3. p.44-45.

BEGARA-MC GORUM, I.; WILDBLOOD, L. A.; CLARKE, C. J.; CONNOR, K. M.; STEVENSON, K.; McINNES, C. J.; SHARP, J. M.; JONES, D. G. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 63, p.265-287,1998.

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.

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

BOELAERT, F.; WALRAVENS, K.; BIRONT, P.;VERMEERSCH, J.P.; BERKYENS, D.; GODFROID, J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. **Veterinary Microbiology**. v.77, p.269-281, 2000.

BUERGELT, C. D.; GINN, P. E. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). **Veterinary Microbiology**. v. 77.p.325-331.2000.

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

CHAFFER, M.; GRINBERG, K.; EZRA, E.; ELAD, D. The effect of sub-clinical Johne's disease on milk production, fertility and milk quality in Israel. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.87-88.

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.

COLLINS, M.; MANNING, E. Relationship to other mycobacteria, taxonomy and nomenclature. Johne's Information Center. University of Wisconsin- Madison, School of Veterinary Medicine. Disponível em : <<http://www.johnes.org/biology>>. Acesso em 29 mar. 2003.

COLLINS, M.; MANNING, E. J. B. Johne's disease – The International Perspective. Disponível em: < <http://alan.kennedy.name/crohns/johneint.htm>>. Acesso em 07 set. 2004.

CORREA, W.M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades Infeciosas dos mamíferos domésticos**. MEDSI. Rio de Janeiro: 1992. 347-349p. Cap.30.

CORTI, S.; STEPHAN, S. A survey of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples all over Switzerland. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.106.

COUQUET, C. Reliability of serological methods for paratuberculosis diagnosis in cattle. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 3. p.51.

COUSINS, D.; MORCOMBE, P.; MOIR, D.; BUTLER, R.; YOUNG, G.; CARSON, B.; EVANS, R.; KALKHOVEN, M. Dealing with incursions in a Johne's disease free zone: Western Australia. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.107-108.

DARGATZ, D.; BYRUM, B.; COLLINS, M.; GOYAL, S.; HIETALA, S.; JACOBSON, R.; KOPRAL, C.; MARTIN, B.; McCLUSKEY, B.; TEWARI, D. Monitoring Johne's ELISA test results across laboratories. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 3. p.47- 48.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Patologia Animal, v.1, n.1, p.109-115, jul./dez.1999.

EUROPEAN COMMISSION. Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis. **Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare**. 21 mar. 2000. p. 76.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v.35, p.173-175, 2002a.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Detection of Anti- *Mycobacterium paratuberculosis* antibodies in Brazilian herds. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002b. Section 7. p.106-107.

FERREIRA,R.; FONSECA, L.S.I.; OELEMAN, .M.R.; LILENBAUM, W. An ELISA for detection of bovine paratuberculosis. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002c. Section 3. p.53.

FERREIRA, A.; MARIANO, I.; CAETANO, M. C.; NÚNCIO, P.; CARRILHO, E.; SOUSA, C.; LOPES, S.; ALMEIDA, V.; PENHA GONÇALVES, A. Epidemiological study of paratuberculosis in ruminants in Alentejo Portugal. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002d. Section 7. p.108-109.

GASTEINER, J.; AWAD-MASALMEH, M.; BAUMGARTNER, W. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. **Veterinary Microbiology**. v. 77. p. 339-349. 2000.

GOMES, M. J. P., **Aspectos epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul** 2002. 129 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, 2002.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; LANZON, L. F.; ASANOME, W.; WUNDER JR, E. A.; RIBEIRO, V. R. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from an infected dairy herd in Southern Region- Brazil. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7, 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002a. Section 7. p.107.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; RIBEIRO, V. R.; WUNDER JR, E. A.; ASANOME, W.; LANZON, L. F.; WALD, V.B. 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, 2002b.

HARRIS, N.B.; BARLETTA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.3, p.489-512. 2001.

JAKOBSEN, M.B.; ALBAN, L.; NIELSEN, S.S. A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 46. p. 15-27. 2000.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J.; KANEENE, J.B.; SPRECHER, D.J.; GARDINER, J.C. LLOYD, J.W. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 46. p. 171-181. 2000.

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

KLAUSEN, J; HUDA, A.; EKEROTH, L.; AHRENS, P. Comparison of milk-and serum ELISA for detection of paratuberculosis in dairy cattle. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 3. p.54.

LAMBETH, C.; REDDACLIFF, L.; WINDSOR, P.; ABBOTT, K.; MCGREGGOR, H.; WHITTINGTON, R. In utero transmission of OJD. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 2. p.42-43.

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

MANUAL MERCK de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7. Ed. São Paulo: Roca, c1997.p. 483-485.

MICHEL, A . L.; BASTIANELLO. Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. **Veterinary Microbiology**. v.77. p.299-307. 2000.

MURPHY, P.; HILL, C.; AUTY, M.; ROSS, P. Effect of Lacticin on the growth of *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP). In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 1. p.18.

NIELSEN, S. S.; THAMSBORG, S. M.; HOUE, H.; BITSCH, V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 44. p. 1-7. 2000.

OCEPEK, M.; KRT, B.; POGACNIK, M. Seroprevalence of paratuberculosis in bull mothers herds in Slovenia. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.85.

PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; SPATH, E.; MARTINIS, D.; ZUMARRAGA, M.; GIOFREE, A.; CATALDI, A.; ROMANO, M. Diagnosis, epidemiology, and Program of Control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.103.

PAOLICCHI, F.A.; ZUMARRAGA, M.J.; GIOFREE, A.; ZAMORANO, P.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; CATALDI, A.; ALITO, A.; ROMANO, M.. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. In: **Journal Medicine Veterinary**. Berlim, v. 50, p.20-26, 2003.

PIAGGIO, J.; NUÑEZ, A.; GIL, A. Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.104.

RAMOS, E. T; POESTER, F. P; CORREA, B. L; OLIVEIRA, S. J.; RODRIGUES, N. C.; CANABARRO, C. E. Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre, v.6, n.34, p.28-32, nov./dez.1986.

RIEMANN, H.P.; ABBAS, B. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 27, p. 481-506, 1983.

ROBBI, C.; ROSSI, I.; NARDELLI, S.; MARANGON, S.; VINCENZI, G.; VICENZONI, G. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in dairy farms in northeastern Italy. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.104-105.

ROUSSEL, A. J.; THOMPSON, J. A.; LIBAL, M. C.; STEWART, E. M.; WITHLOCK, R. L.; BARLING, K. S.; HAIRGROVE, T. B. Prevalence and risk factors for paratuberculosis among beef cattle in the state of Texas, USA. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.86-87.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A.W; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. 13-21p. Cap.2.

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, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 1. p.16-17.

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

SEVILLA, I.; ADURIZ, G.. GARRIDO, J. M.; GEIJO, M. V.; JUSTE, R. A. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.84-85.

SILVA, A . C. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. Recife: Universidade Rural de Pernambuco. Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação,1990. 157p. (Trabalho técnico; n.2).

STABEL, J.R. Johne's disease: a hidden threat. **Jornal of Dairy Science**. v. 81. p. 283-288.1998.

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, 1993. p.823-830.

STEPHEN, L.O .; SCOTT, J. W.; BRUCE, A. W. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine** . v. 40. p. 179-192. 1999.

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

STERNBERG, S.; HOLMSTROM, A.; VISKE, D.; ROBERTSSON, J. A.; BÖLSKE, G.; LARSSON, B. Control programme for paratuberculosis in Swedish beef herds. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7. 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002b. Section 7. p.100-101.

THORNE, J.G.; HARDIN, L.E.; Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA, cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v.31, p. 51-57, 1997.

VAN MAANEN, C.; KOSTER, C.; VAN VEEN, B.; KALIS, C. H. J.; COLLINS, M. T. Validation of *Mycobacterium paratuberculosis* antibody detecting ELISAs. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 3. p.46-47.

WHITLOCK, R. H.; WELLS, S. J.; SWEENEY, R. W.; VAN TIEM, J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. **Veterinary Microbiology**. v. 77.p.387-398. 2000.

WOOD, P.R.; KOPSIDAS, K.; MILNER, A.R.; HILL, J.; GILL, I.; WEBB, R.; MACK, W.N. & COATES, K. The development of an in vitro cellular assay for the Johne's disease in cattle In: **Johne's disease: Current Trends in Research Diagnosis and Management**. CSIRO Publication. Melbourne. Australia p. 164-167, 1989.

WRAIGHT, M. D. ; MCNEIL, J.; BEGGS, D. S.; GREENALL, R. K.; HUMPHRIS, T. B.; IRWIN, R. J.; JAGOE, S.P; JEMMESON, A.; MORGAN, W. F.; BRIGHTLING, P.; ANDERSON, G. A.; MANSELL, P. D. Compliance of Victorian dairy farmers with current calf fearling recommendations of control of Johne's disease. **Veterinary Microbiology**. v. 77. p.429-442. 2000.

YAYO AYELE, W.; FISCHER, O.; SVASTOVA, P.; ALEXA, M; MACHACKOVA, M. PAVLIK, I. Dairy and beef cattle paratuberculosis survey in intensive and extensive farming conditions. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.85-86.

YOKOMIZO, Y.; MORI, Y.; FUJIMORI, N.; TACHIBANA, S. Current progress of the National Program to control bovine paratuberculosis in Japan. In: International Colloquium on Paratuberculosis, 7., 2002 Bilbao. **Abstracts...**: Bilbao: International Association for Paratuberculosis, 2002. Section 7. p.118-119.