



**Universidade Federal do Pará
Instituto de Medicina Veterinária
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Alessandra dos Santos Belo Reis

Estudo da paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Maranhão

**Belém
2016**

Alessandra dos Santos Belo Reis

Estudo da paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Maranhão

Defesa de Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Instituto de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Sanidade Animal. Orientação Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

**Belém
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Reis, Alessandra dos Santos Belo, 1986-
Estudo da paratuberculose em búfalos (*Bubalus
bubalis*) no estado do Maranhão / Alessandra dos Santos
Belo Reis. - 2016.

Orientador: José Diomedes Barbosa Neto;
Coorientador: Felipe Salvarani.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Campus de Castanhal, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2016.

1. Búfalo -- Doenças -- Maranhão. 2.
Paratuberculose -- Diagnóstico. I. Título.

CDD 22. ed. 636.293098121

Alessandra dos Santos Belo Reis

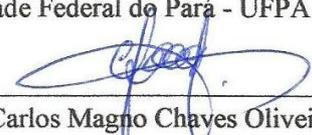
Estudo da Paratuberculose em Búfalos (*Bubalus bubalis*) no Maranhão

Defesa de Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Sanidade Animal.
Orientação Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

Data da aprovação. Belém - PA: 11/03/2016

Banca Examinadora


Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto
Universidade Federal do Pará - UFPA


Prof. Dr. Carlos Magno Chaves Oliveira
Universidade Federal do Pará – UFPA


Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani
Universidade Federal do Pará - UFPA


Prof.^a Dra. Marilene de Farias Brito
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ


Méd. Vet. Dra. Tattane Teles Albernaz Ferreira
Universidade Federal do Pará – UFPA

Ao Professor Carlos Hubinger Tokarnia, pelos
seus ensinamentos e lição de vida.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará.

A Deus, pois sem ele nada teria sido possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto, por acreditar em mim, pela orientação competente, conselhos, críticas, paciência, oportunidade, enfim pela sua presença marcante.

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio, amor e confiança depositados em mim.

As minhas irmãs, Suelem e Emanuela, pelo companheirismo e momentos de alegria.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAN) e Saúde animal na Amazônia (PPGSAAM), pelas aulas ministradas e pelo conhecimento adquirido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de Bolsa de Doutorado.

Ao Professor Dr. Felipe Masiero Salvarani e Prof.^a Dra Marilene de Farias Brito, pela co-orientação e pelas suas colaborações na parte escrita dos artigos científicos e Tese.

Ao Professor Dr. Carlos Magno Oliveira pela supervisão no estágio à docência.

Aos amigos e colegas de trabalho, que me ajudaram na coleta de dados e materiais para a realização deste trabalho, Henrique dos Anjos Bomjardim (Henrico), José Alcides S. da Silveira, Natália da Silva e Silva, Marcel Passos, Francisberto Barbosa e Méd. Vet. Aline (Maranhão).

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de patologia, pela realização das análises histopatológicas, em especial à Professora Dra. Marilene de Farias Brito e Professor Daniel Ubiali.

Ao Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior, do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), pela oportunidade de realizar as análises de PCR. E aos colegas que me ajudaram na realização das análises, Ana Cláudia, Lívia, Mayara, Michele Freitas e Ana Paula.

Ao Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite e Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de RETROVIROSES em Minas Gerais. E aos colegas que me ajudaram na parte de análise de material, Cairo Henrique, Fernanda Oliveira e João Hélder.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) pelo apoio financeiro.

Ao Projeto Procad Novas Fronteiras 2008 - 50400002, "Pesquisa e Pós-graduação em Nutrição Animal na Amazônia: Articulação entre Ciência Animal/UFPA/UFRA/Embrapa e Zootecnia/UFMG, na área de Zootecnia (Zootecnia/Recursos Pesqueiros) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Evandro Chagas pela realização das dosagens de minerais.

Aos amigos que conquistei durante minhas estadias nos laboratórios e viagens, que me ajudaram com seu companheirismo e conversas, Fernanda Oliveira, Fernanda Dorella, Janaína Teles, Ana Paula, Graziela e esposo.

As fazendas por permitirem a coleta de dados e materiais para realização do trabalho.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho.

A todos os colegas de trabalho pela convivência e companheirismo.

A todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

"Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade."

Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho objetivou estudar a paratuberculose (PTB) em bubalinos no estado do Maranhão (MA). Para isso foram realizadas a utilização da biópsia retal como ferramenta auxiliar na coleta de amostras para o diagnóstico *ante mortem* da PTB; dosagens dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) em animais positivos para PTB, assim como, o relato da detecção de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (*Map*) em útero e feto bubalino. No primeiro estudo foram realizadas 140 biópsias retais em bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços, com idade acima de três anos, no município de São Mateus, MA. Essas biópsias foram processadas por meio das técnicas de Ziehl-Neelsen (ZN) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Adicionalmente foi realizada necropsia de 11 búfalos com sinais clínicos sugestivos de PTB, coletadas amostras de íleo e linfonodo mesentérico (LM) para a realização de ZN e qPCR. Pela coloração de ZN das biópsias retais, 4,3% (6/140) apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e na qPCR, 5% (7/140) tiveram amplificação do material genético. As lesões anatomopatológicas de quatro animais foram compatíveis com lesões sugestivas de PTB, apresentaram BAAR e amplificação de material genético. A concordância entre a biópsia retal e a análise dos tecidos de íleo e LM, segundo o teste Kappa foi alta ($K=0,792$). No segundo estudo, foram realizadas 13 necropsias em búfalos das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços, com idade acima de três anos, nos municípios de São Mateus e São Luís, MA. Foram coletadas amostras de íleo e LM para pesquisa de *Map* e de fígado para dosagem de minerais (Cu, Zn e Fe). Sete búfalos foram positivos para PTB e alocados no Grupo 1; seis búfalos foram negativos e alocados no Grupo 2. Na dosagem dos microminerais, os búfalos do Grupo 1 apresentaram níveis abaixo dos valores de referência para Cu e Zn. Observou-se que a média dos teores de Cu foi 18,0ppm e de Zn 68,6ppm. No Grupo 2 a média dos teores de Cu foi 113,7ppm e de Zn 110,0ppm. Os teores de Fe em ambos os grupos foram elevados (>669 ppm). O terceiro estudo foi conduzido em uma propriedade em São Luís, MA. Uma búfala prenha, com acentuada debilidade física e com suspeita clínica de PTB foi eutanasiada e necropsiada. Foram coletados fragmentos de íleo, LM, útero e placenta da fêmea; fragmentos de rim, fígado, vaso umbilical e sistema digestivo (SD) do feto e analisadas através de ZN e qPCR. A fêmea foi positiva em amostras de íleo, LM e útero na qPCR e o feto foi positivo no SD. No íleo, LM e nas fezes foram observados BAAR. Conclui-se que a análise de biópsia retal pode ser empregada para auxiliar no diagnóstico *ante mortem*. A PTB pode induzir quadros de deficiência mineral com consequente piora do quadro clínico da doença. E a presença de *Map* em búfalos pode ocorrer

em vários órgãos, inclusive no sistema reprodutivo e a transmissão intrauterina pode ocorrer nesta espécie.

Palavras-chave: Doença de John. Biópsia retal. Infecção intrauterina. Minerais. Bubalinos.

ABSTRACT

This study investigated paratuberculosis (PTB) in water buffaloes in the state of Maranhão (MA). For that were performed using the rectal biopsy as an auxiliary tool in the collection of samples for *ante mortem* diagnosis of PTB; dosages of copper (Cu), zinc (Zn) and iron (Fe) in PTB positive animals was performed, as well as the report of the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) in the utero and fetus of a buffalo. In the first study were conducted 140 rectal biopsies in buffaloes of Murrah, Mediterranean and their crossbreeds, over the age of three years in São Mateus, MA. These biopsies were processed by Ziehl-Neelsen (ZN) staining and quantitative PCR (qPCR). Postmortem examination of 11 buffaloes with clinical signs suggestive of PTB was performed and samples of ileum and mesenteric lymph nodes (MLN) were collected for performing qPCR and ZN. By ZN staining of rectal biopsies, 4.3% (6/140) acid-fast bacilli and qPCR, 5% (7/140) had amplification of genetic material. The pathological lesions of four animals were consistent with lesions suggestive of PTB showed acid-fast bacilli and amplification of genetic material. The correlation between rectal biopsy and analysis of ileal tissue and LM, according to the Kappa test was high ($K=0.792$). In the second study, 13 postmortem examination were carried in buffaloes of Murrah, Mediterranean and their crossbreeds, over the age of three years in the cities of São Mateus and São Luís, MA. Ileum and mesenteric lymph nodes samples were collected for Map search and liver to dosage minerals (Cu, Zn and Fe). Seven buffaloes were positive for PTB and allocated in Group 1; six buffaloes were negative and allocated in Group 2. In the dosing of trace minerals in Group 1 showed levels below the reference values for Cu and Zn. It was observed that the average Cu concentration was 18.0ppm and Zn 68.6ppm. In Group 2 the average Cu concentration was 113.7ppm and Zn 110.0ppm. The iron concentrations in both groups were high (>669 ppm). The third study was conducted on a property in São Luís, MA. A buffalo cow pregnant with marked physical debility and clinical signs suggestive of PTB was eutanasiada and necropsiada. Fragments ileum, MLN, uterus, and placenta of buffalo cow were collected; fragments of kidney, liver, umbilical vessel and digestive system (DS) of the fetus were collected and were analyzed by Zn and qPCR. The buffalo cow was positive in ileum samples, mesenteric lymph nodes and uterus in qPCR and the fetus was positive in DS. In the ileum, MLN and feces were observed acid-fast bacilli. It is concluded that rectal biopsy analysis can be used to help diagnose *ante mortem*. The PTB could lead to mineral deficiency and worsen the clinical condition of the buffaloes. The

presence of Map in buffalo can occur in various organs, including the reproductive system and intrauterine transmission can occur in this species.

Key-words: John's disease. Rectal biopsy. Intrauterine infection. Minerals. Buffaloes.

LISTA DE ABREVIÇÕES

AGID - Imunodifusão em Gel de Agarose

BAAR – Bacilos Álcool Ácido Resistentes

Cu - Cobre

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DP – Desvio Padrão

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbant Assay

Fe – Ferro

HE – Hematoxilia-eosina

IHQ – Imunohistoquímica

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LM – Linfonodo Mesentérico

Map – *Mycobacterium avium* subesp. *Paratuberculosis*

mg/kg – miligrama por kilo

NNP – Nitrogênio não protéico

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

ppm – partes por milhão

PTB – Paratuberculose

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

UI – Unidade Internacional

ZN – Ziehl-Neelsen

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. HISTÓRICO	15
2.2. HISTÓRICO NO BRASIL	15
2.3. ETIOLOGIA	18
2.4. EPIDEMIOLOGIA	19
2.5. PATOGENIA	21
2.6. SINAIS CLÍNICOS	22
2.7. PATOLOGIA	23
2.7.1. Achados Macroscópicos	23
2.7.2. Achados Microscópicos	24
2.8. DIAGNÓSTICO	24
2.9. TRATAMENTO	26
2.10. CONTROLE E PROFILAXIA	26
2.11. POTENCIAL ZONÓTICO (DOENÇA DE CROHN)	26
REFERÊNCIAS	29
3. ARTIGO 1- DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSE POR BIÓPSIA RETAL EM BÚFALOS.....	37
ABSTRACT	37
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45
4. ARTIGO 2- TEORES DE COBRE, ZINCO E FERRO NO FÍGADO DE BÚFALOS (<i>Bubalus Bubalis</i>) COM PARATUBERCULOSE	51
ABSTRACT	51
RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53

MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	59
5. ARTIGO 3- SHORT COMMUNICATION: INFECCÃO INTRAUTERINA POR <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> EM BÚFALO (<i>Bubalus bubalis</i>)	63
ABSTRACT	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	69
6. CONCLUSÃO GERAL	73

1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura é um setor do agronegócio brasileiro que está em desenvolvimento no Brasil como uma alternativa rentável, principalmente por conta da rusticidade da espécie. A produção e o consumo de leite e carne de búfalas crescem em função da demanda por alimentos. A carne desses animais também é apreciada por conter menores índices de gordura, colesterol, calorias e mais proteína e minerais que a dos bovinos (MAPA, 2011). O Brasil possui um rebanho bubalino de aproximadamente 1.470 milhões de cabeças. A região Nordeste, conta com um itinerário de 120.458 cabeças, sendo o estado do Maranhão com maior efetivo bubalino, aproximadamente 77.800 animais que representam 6,5% do rebanho nacional (MAPA, 2014).

A paratuberculose (PTB) ou doença de Johne é uma enterite granulomatosa, crônica, infecciosa, sem cura ou tratamento, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Pode acometer mamíferos, principalmente ruminantes domésticos e selvagens, sendo que a infecção se dá pela ingestão de colostro, leite ou água contaminados com fezes de animais doentes (RIET-CORREA & DRIEMEIER, 2007; MOTA et al., 2010). As perdas econômicas verificadas em função da infecção subclínica se devem principalmente à redução da conversão alimentar, diminuição da produtividade, redução dos níveis de proteína e gordura no leite e perda de peso ao abate (CLARKE, 1997). A doença caracteriza-se clinicamente por diarreia, síndrome de má absorção e consequente perda de peso dos animais acometidos (CHIODINI et al., 1984).

A enfermidade apresenta distribuição mundial, e foi descrita pela primeira vez em 1895 por Johne e Frothingham na Alemanha (MANNING & COLLINS, 2010). No Brasil, a PTB já foi diagnosticada em búfalos por Mota et al. (2010) em Pernambuco, Barbosa et al. (2010) no Maranhão, Dalto et al. (2012) no Rio Grande do Sul e Brito et al. (2015) em Alagoas e Maranhão. Para a confirmação do diagnóstico deve ser realizada necropsia, baseando-se o diagnóstico nos achados macro e microscópicos (DACORSO FILHO et al., 1960), ainda podem ser realizadas coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), provas de imunohistoquímica (COELHO et al., 2008), cultivo bacteriológico (GOMES et al., 2002) e reação em cadeia de Polimerase (PCR) (WHITTINGTON et al., 1998; SHIN et al., 2004).

Esse trabalho teve como objetivo realizar estudo da paratuberculose em bubalinos no estado do Maranhão. Para isso foram realizadas a utilização da biópsia retal como ferramenta auxiliar na coleta de amostras para o diagnóstico *ante mortem* da PTB; dosagens dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) em animais positivos para PTB, assim como, o relato da detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) em útero e feto bubalino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Johne e Frothingham em 1895 relataram pela primeira vez na Alemanha um caso de paratuberculose. A princípio acreditava-se tratar de um caso de tuberculose atípica, no qual uma vaca de seis anos apresentava perda de peso progressiva e diarreia crônica. Durante a necropsia foi detectado espessamento do intestino delgado com mucosa enrugada. O material foi encaminhado ao Instituto de Patologia de Dresden, onde os patologistas H. A. Johne e L. Frothingham observaram na parede intestinal a infiltração por leucócitos, além de células epitelioides e células gigantes. Através da coloração especial para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), verificou-se grande quantidade de bactérias agrupadas, compatíveis com *Map* (KREEGER, 1991; GOMES, 2002; LILENBAUM et al., 2007).

A doença já estava distribuída por rebanhos do mundo todo; por volta de 1900, Bang propôs que o seu nome fosse Paratuberculose (PTB), pois apesar de ser semelhante à tuberculose possuía entidade diferente. Bang reconheceu que a tuberculina aviária poderia ser utilizada como reagente no diagnóstico da enfermidade e estabeleceu associação do agente da PTB com *Mycobacterium avium* (GOMES, 2002).

No ano de 1910, F.W. Trowt cumpriu os postulados de Koch e isolou o agente da PTB e, mais tarde, reproduziu a doença experimentalmente. Em 1916, McFadyean propôs que a enfermidade se chamasse Doença de Johne, e então denominou de jonina o produto equivalente à tuberculina usada para o diagnóstico da PTB. Em 1923, o agente foi chamado oficialmente de *Mycobacterium paratuberculosis* no Manual de Bergey (MANNING; COLLINS, 2010).

Nas décadas seguintes, os estudos sobre a doença foram intensificados e evidenciou-se sua distribuição mundial, com acometimento inclusive de animais silvestres (GOMES, 2002; MANNING; COLLINS, 2010). Na década de 80 e início da década de 90, muitos pesquisadores sugeriram que *Map* fosse o agente etiológico da Doença de Crohn (CHIODINI, 1989; McFADDEN et al., 1987; COCITO et al., 1994).

Em bubalinos a doença foi diagnosticada no Paquistão (SIVAKUMAR et al., 2006), Índia (YADAV et al., 2008), Itália (DESIO et al., 2013) e no Brasil (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; DALTO et al., 2012; BRITO, 2015).

2.2. HISTÓRICO NO BRASIL

O professor Otávio Dupont registrou o primeiro relato da enfermidade no Brasil em animais da raça Flamengo importados da Bélgica para o Estado do Rio de Janeiro e foi

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 & Silva relataram a doença no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, em um touro da raça holandesa de seis anos de idade, e que havia sido importado da Holanda com um ano e meio de idade.

Em 1960, a enfermidade foi descrita em um touro filho de vaca importada da Holanda e em dois bovinos nacionais da raça Jersey, no Rio de Janeiro. Esses três casos foram confirmados por histopatologia com verificação de BAAR na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (DACORSO FILHO et al., 1960). Subsequentemente, casos de PTB foram registrados em um bovino nativo no Rio de Janeiro (SILVA; PIZELI, 1961), em dois bovinos em Santa Catarina: um nacional e outro importado da Holanda (PORTUGAL et al., 1979), em um touro Holandês nascido no Rio Grande do Sul e mantido em uma central de inseminação (RAMOS et al., 1986) e em uma vaca nascida nos Estados Unidos, importada para o Paraná e transportada para Minas Gerais (NAKAJIMA et al., 1991).

Em 1994, foi reproduzida a enfermidade experimentalmente em caprinos no Brasil através da inoculação de fragmentos de intestino de um bovino afetado com PTB (POESTER; RAMOS, 1994). 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.

Dias et al. (2002) isolaram *Map* de amostras de fezes de bovinos com suspeita de PTB em um rebanho da Paraíba. Cunha et al. (2003) relataram PTB em um bovino no Estado de Goiás. No Rio de Janeiro, Ferreira et al. (2003) descreveram outro caso de PTB em bovino e Ristow et al. (2006) confirmaram através de cultivo bacteriano PTB em um rebanho bovino. Relatos adicionais de PTB no Brasil incluíram um rebanho afetado em Pernambuco (MOTA et al., 2007), três bovinos na Paraíba (OLIVEIRA et al., 2008), rebanhos bovinos leiteiros em Minas Gerais (CARVALHO, 2008) em um rebanho bovino leiteiro da raça Gir na Paraíba (MOTA et al., 2009) e em um caprino em São Paulo (JACINTHO et al., 2009).

Oliveira et al. (2010) relataram casos naturais de PTB em caprino e ovino na Paraíba, confirmado através de exames histopatológicos e imunohistoquímicos. Mota et al. (2010) relataram o primeiro caso de paratuberculose em búfalos em Pernambuco. Dois animais foram necropsiados e apresentavam lesões principalmente no intestino delgado com evidente espessamento da mucosa, aumento de linfonodos mesentéricos, além de vasos linfáticos proeminentes e dilatados. Os casos foram confirmados pelas lesões histopatológicas e PCR. Barbosa et al. (2010) também descreveram dois casos de paratuberculose em bubalinos no

Maranhão, com lesões semelhantes às encontradas por Mota et al. (2010); o diagnóstico foi confirmado através dos achados microscópicos e coloração de ZN.

Carvalho et al. (2012) realizaram PCR IS900, clonagem e sequenciamento genético em um rebanho leitero bovino em Minas Gerais.

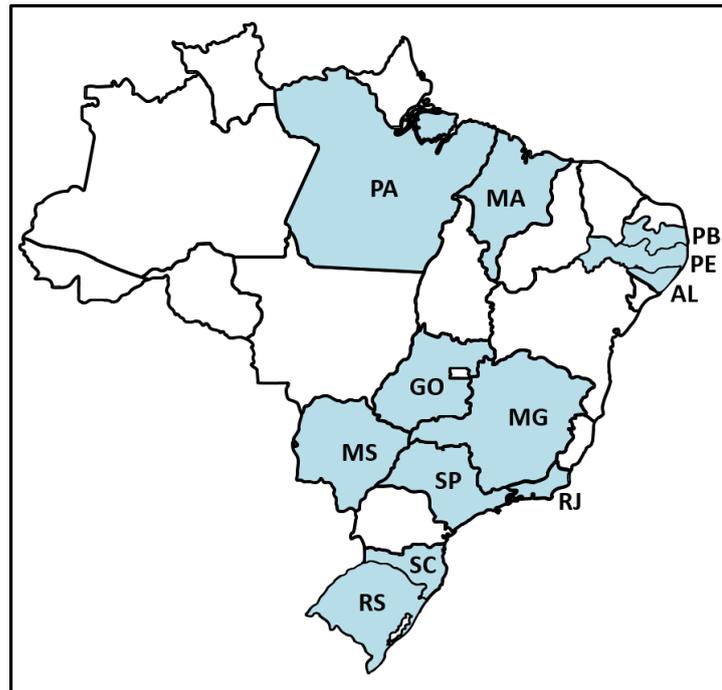
Dalto et al. (2012) realizaram um estudo de paratuberculose em um rebanho bubalino no Rio Grande do Sul; seis animais apresentaram diarreia crônica e perda de apetite e de peso. À necropsia observou-se linfonodos mesentéricos aumentados de volume e a mucosa do intestino se encontrava espessada e com aspecto cerebroide. No exame histológico foi observada inflamação granulomatosa difusa do duodeno até o intestino grosso. A coloração de ZN revelou BAAR no interior de macrófagos e a imunohistoquímica foi positiva.

Yamasaki et al. (2013b) realizaram diagnóstico de paratuberculose através de histopatologia e imunohistoquímica em bovinos leiteiros no Rio de Janeiro. Um caso de paratuberculose foi diagnosticado em bovino de corte no estado do Pará (BELO-REIS et al., 2013).

Fiss et al. (2015) diagnosticaram paratuberculose em dois bovinos de corte através dos achados anatomopatológicos e PCR IS900 no Rio Grande do Sul. Brito et al. (2015) realizaram um estudo da PTB em rebanhos bubalinos na região nordeste do Brasil e diagnosticaram a enfermidade através dos achados anatomopatológicos, ZN e PCR, nos estados do Maranhão e Alagoas. Belo-Reis et al. (2015) realizaram diagnóstico de paratuberculose em búfalos através de análise de biópsia retal no Maranhão.

Levantamentos sorológicos foram realizados no Mato Grosso do Sul (RIVEIRA, 1996; FERREIRA et al., 2001), São Paulo (RIVEIRA, 1996; FONSECA et al., 2000), Pará (SILVA, 2005) e Goiás (ACYPRESTE et al., 2005) em bovinos; e na Paraíba (MEDEIROS et al., 2012) em caprinos e ovinos. Portanto, atualmente, o Brasil possui 12 estados com relatos de PTB, como demonstrado na Figura 1.

Fig. 1. Mapa do Brasil - Estados brasileiros com relatos da ocorrência de paratuberculose até 2015.



Adaptado de YAMASAKI (2010).

2.3. ETIOLOGIA

A paratuberculose ou enterite paratuberculosa, ou doença de Johne como também é conhecida é causada por *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis* (*Map*) (CHIODINI et al., 1984; SILVA, 1990), pertencente à Família *Mycobacteriaceae* (THOREL, 1990).

As micobactérias são bastonetes pequenos (0,5 x 1,5 µm), gram-positivos, aeróbicos não esporulados e de crescimento lento em meio de cultivo. Muitas das características do agente estão relacionadas com sua parede celular que possui grande quantidade de material gorduroso (ácido micólico que forma uma camada cérea). Isso faz com que a bactéria seja resistente a condições adversas, tais como ressecamento e drogas antibacterianas (cloranfenicol e penicilina), as quais são adicionadas aos meios de cultura a fim de evitar crescimento de outros agentes (SILVA, 1990). Além disso, essa peculiaridade da parede celular de *Map* faz com que após a coloração, a bactéria seja resistente ao efeito descorante do álcool ácido, sendo assim descrita como fortemente álcool-ácido-resistente, característica fundamental no reconhecimento dos patógenos desse grupo pelo método de Ziehl-Neelsen. Os nutrientes também entram devagar por essa camada e, desta forma, a bactéria apresenta crescimento lento em meio de cultivo (CHIODINI, 1993; GOMES, 2002; LILENBAUM et al., 2007).

Muitas bactérias, assim como *Map*, são dependentes de ferro para sua sobrevivência e virulência. A maioria das micobactérias produz micobactina, que é um complexo solúvel de ferro captado pelos receptores da membrana, porém *Map* não produz micobactina, o que o torna incapaz de captar ferro fora do hospedeiro (CLARKE, 1997; GOMES, 2002). No entanto, Lambrecht e Collins (1992) demonstraram que a alteração do pH do meio e a concentração de ferro influenciaram o crescimento de *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).

Quanto à sua sobrevivência, estudos demonstraram que o agente sobrevive melhor em solo úmido ou alagado do que em solo seco e exposto a temperaturas elevadas. Nas fezes e no solo sobrevive aproximadamente um ano. A sobrevivência é inibida pela exposição à luz do sol, urina, e pelo processo de ensilagem (STEHMAN, 1993; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007; JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

A PTB é de ocorrência mundial e acomete principalmente ruminantes domésticos e selvagens. A doença já foi diagnosticada em bovinos, ovinos, caprinos, ruminantes silvestres, equinos, suínos, coelhos e raposas (OIE, 2008). Em bubalinos a doença foi diagnosticada no Paquistão (SIVAKUMAR et al., 2006), Índia (YADAV et al., 2008), Itália (DESIO et al., 2013) e no Brasil (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; DALTO et al., 2012; BELO REIS et al., 2015; BRITO, 2015).

Tanto bovinos como outras espécies podem ser portadores assintomáticos de *Map*, principal forma de introdução da doença em rebanhos livres. A infecção geralmente ocorre nos primeiros meses de vida, podendo ocorrer a infecção intrauterina; porém a doença se manifesta com maior frequência entre dois e cinco anos de idade e ocasionalmente, animais jovens são afetados. Os bovinos que adoecem, normalmente são aqueles infectados nas primeiras semanas de vida (HAGAN, 1938; TAYLOR, 1953); dos animais infectados, alguns desenvolvem a enfermidade e outros, em sua maioria, eliminam o agente sem apresentar sinais clínicos. 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 num rebanho, para cada caso clínico de paratuberculose existam entre 15 a 25 animais subclínicos (SWEENEY, 1996).

Animais jovens apresentam maior susceptibilidade à infecção por *Map*, e alguns fatores podem contribuir, tal como pH do intestino, pois bezerros lactentes possuem maior

acidez intestinal comparado aos adultos, fato que favorece a sobrevivência da micobactéria (RICHARDS, 1981); o colostro ingerido pelos bezerros contém altos teores de lactoferrina e transferrina (MOMOTANI et al., 1988). Tais proteínas possuem ação antimicrobiana (YAMASAKI, 2010), porém aumentam a sobrevivência de *Map*, pois formam complexos moleculares com o ferro utilizado pela micobactéria para a produção de micobactina, tanto por *Map* (MOMOTANI et al., 1988) como por outras bactérias, tais como, coliformes, salmonelas e pseudomonas; os anticorpos maternos presentes no leite podem agir como opsoninas, e auxiliam na entrada da micobactéria nas células carreadoras de macromoléculas (células M) e enterócitos (MOMOTANI et al., 1988); e outras condições como carga de microrganismos, estresse, doenças imunossupressivas e período pós parto são considerados fatores desencadeantes do processo e influenciam na susceptibilidade dos animais à infecção (STABEL, 1998).

A principal forma de transmissão de *Map* é orofecal, na qual, animais infectados que eliminam o agente, contaminam pastagens e água e disseminam o patógeno para outros animais (SWEENEY, 1996). O agente também é excretado no leite e colostro, constituindo importante via de propagação da enfermidade dentro de um rebanho (DALTO, 2011). Alguns autores afirmam a ocorrência da transmissão intrauterina e atentam para que essa forma de transmissão seja levada em consideração na implantação de medidas de controle em rebanhos acometidos (WHITTINGTON; WINDSOR, 2007). *Map* já foi detectado no útero, aparelho reprodutivo masculino e no sêmen, líquido alantoide e feto de bovinos (SILVA; PIZELLI, 1961; SEITZ et al., 1989; BUERGELT et al., 2006; KHOL et al., 2010); nos cotilédones e tecidos de fetos de ovelhas (LAMBETH et al., 2008); e útero e feto de bubalino (BELO-REIS et al., 2016).

O confinamento é um fator de alto risco, pois há grande contaminação do ambiente com fezes de animais infectados (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007).

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 por *Map*; um ambiente ácido aumenta a captação do ferro pela micobactéria (JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997).

Atualmente no Brasil, pode-se afirmar que a importação de bovinos infectados não é mais considerada um aspecto epidemiológico importante, devido a variados relatos da PTB em animais nascidos e criados no país (YAMASAKI et al., 2013a).

2.5. PATOGENIA

Após a ingestão de alimento contaminado, *Map* sofre endocitose pelas células M que recobrem o tecido linfoide do jejuno e íleo, especialmente as placas de Peyer (BANNANTINE; BERMUDEZ, 2013). A função das células M é transportar macromoléculas e antígenos da barreira epitelial do lúmen intestinal para o tecido linfoide; no entanto, em certas ocasiões, tornam-se via de infecção para alguns patógenos (WOLF; BYE, 1984). Na membrana das células M existem estruturas conhecidas como fibronectinas, o agente se adere a essas estruturas, são fagocitados e transferidos para a lâmina própria da mucosa e em seguida, são capturados pelos macrófagos, os quais, quando infectados e durante a migração para os linfáticos intestinais, espalham o agente para os linfonodos mesentéricos (BANNANTINE; BERMUDEZ, 2013), e formam assim, lesões granulomatosas que podem causar má-absorção de nutrientes (STABEL, 1998), e consequente fraqueza muscular, hipoproteinemia e edema (CARTER, 1988).

A localização das placas de Peyer, em maior proporção no íleo, pode explicar o porquê das lesões intestinais se iniciarem nessa região (BANNANTINE; BERMUDEZ, 2013). A membrana mucosa torna-se enrugada e espessada devido ao acúmulo de células epitelioides e gigantes, contendo vários microrganismos que podem ser eliminados com as fezes (CARTER, 1988).

Há excessiva produção local de IgG na mucosa intestinal, que forma complexos imunes, que possuem atividade quimiotáxica direcionada para os macrófagos, que pode provocar a desgranulação dos mastócitos, e liberação de histamina, o que resulta na inflamação e vasodilatação local, o que implica na patogênese da diarreia na PTB (STEHMAN, 1993).

Na fase terminal da enfermidade, os macrófagos infectados afetam os vasos sanguíneos, penetram na corrente circulatória e provocam disseminação de *Map* para outros órgãos como fígado, rins, pulmões, úbere e trato reprodutor (SWEENEY et al., 1992). Alguns animais que se contaminam com *Map* podem desenvolver resistência rapidamente, controlam a infecção e não se tornam eliminadores do patógeno. Outros animais controlam a infecção parcialmente, se tornam portadores assintomáticos, que liberam o patógeno e contribuem para a disseminação da enfermidade. Há também os animais em que *Map* persiste na mucosa intestinal e nos linfonodos e desenvolvem a doença (RADOSTITS et al., 2002).

A PTB é uma enfermidade que possui períodos de flutuações da imunidade celular e humoral o que, em associação com o longo período de incubação, dificulta a realização de métodos diagnósticos (CHIODINI et al., 1984; CARRIGAM; SEAMAN, 1990). O longo

tempo de incubação da enfermidade permite a excreção dos microrganismos pelas fezes, por até 18 meses, antes do início dos sinais clínicos. No entanto, a maior quantidade de *Map* é eliminada quando o animal já está na fase final da infecção, ou seja, quando apresenta a diarreia (CHIODINI et al., 1984).

Na paratuberculose também tem sido descrita mineralização do endocárdio e da parede das artérias, assim como da parede do rúmen, no entanto, a patogenia desta alteração não está completamente esclarecida (ALIBASOGLU et al., 1962; BUERGELT et al., 1978; DRIEMEIER et al., 1999). Calcificação da íntima das artérias tem sido descrita em diversas doenças caquetizantes em bovinos tais como a paratuberculose e a tuberculose. Também é um achado de necropsia incidental em animais velhos. Trata-se, portanto, de uma lesão inespecífica (DRIEMEIER et al., 1999).

2.6. SINAIS CLÍNICOS

Os primeiros sinais clínicos da paratuberculose são perda de peso e queda na produção. Em muitos animais a doença não progride, mesmo porque são eliminados antes de apresentarem sinais mais característicos. No caso de haver evolução da doença observa-se perda progressiva de peso, desidratação, apetite normal, diarreia intermitente profusa, homogênea, semifluida ou líquida, esverdeada no início que se torna marrom escura, não responsiva a tratamentos, que resultam em morte do animal (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007).

Segundo Radostits et al. (2002) existem quatro estágios da doença:

1°. Infecção silenciosa: na qual não existem sinais clínicos nem efeitos de perdas produtivas, porém o animal pode eliminar o patógeno, sendo possível a demonstração de *Map* em tecidos e na cultura de fezes.

2°. Doença subclínica: se percebem perdas produtivas, como diminuição da produção de leite, diminuição da conversão alimentar, aparecimento de mastites, infertilidade, e outros problemas que resultam em perdas econômicas.

Esses animais podem ter seu diagnóstico realizado pela cultura de fezes e presença de anticorpos no sangue, porém, nesse caso, esses exames são de baixa sensibilidade, o que dificulta o controle, pois os animais que não forem descartados poderão evoluir para o terceiro estágio.

3°. Doença clínica: ocorre geralmente em animais com mais de dois anos. Há perda de peso progressiva, porém chama a atenção que o animal não perde o apetite nem a sede. Em bovinos e bubalinos, concomitante à perda de peso ocorre diarreia que pode ser contínua ou

intermitente. As perdas produtivas se acentuam com queda acentuada dos índices de produção. Temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória se mantêm dentro dos limites normais. Observa-se que o animal não responde a tratamentos.

4°. Doença clínica em estágio avançado: os sinais clínicos se acentuam e levam o animal à morte. A perda de peso é muito evidente e os animais ficam caquéticos. Edema submandibular pode estar presente. À medida que a diarreia aumenta, o edema tende a desaparecer e o animal pode apresentar desidratação e debilidade.

2.7. PATOLOGIA

2.7.1. Achados Macroscópicos

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; DALTO et al., 2012).

A válvula íleocecal mostra-se inflamada e aumentada de tamanho em até 15 a 20 vezes (SILVA, 1990). Os linfonodos mesentéricos apresentam-se aumentados de volume, 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; DALTO et al., 2012).

Classicamente, a mucosa tem aparência enrugada, apresenta um aumento na espessura da parede intestinal de três a quatro vezes a mais que o normal e com aspecto das circunvoluções cerebrais (SILVA, 1990; DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2010). Os vasos linfáticos ficam nitidamente visíveis e proeminentes devido à inflamação, o que confere aspecto varicoso e pode se estender desde a serosa intestinal até o mesentério. Essa característica macroscópica é presuntiva do diagnóstico da PTB à necropsia (CLARKE, 1997; DRIEMEIER et al., 1999; YAMASAKI, 2010; DALTO et al., 2012).

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; YAMASAKI, 2010; DALTO, 2011). Em alguns casos, essa mineralização ocorre na parede do rúmen (DRIEMEIER et al., 1999; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007; DALTO 2011). Em casos de enfermidade terminal, na qual o animal está caquético, pode haver atrofia de musculatura e gordura, além de edema na região submandibular e presença de fluidos nas cavidades torácica e abdominal (DRIEMEIER et al.,

1999; YAMASAKI, 2010; DALTO, 2011). Em animais que não estão em estágios muito avançados da enfermidade não se observam muitas alterações macroscópicas (CLARKE, 1997).

2.7.2. Achados Microscópicos

Na microscopia as principais alterações observadas estão no intestino delgado, nos vasos linfáticos e nos linfonodos mesentéricos, sob forma de enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas. No intestino, a lesão é principalmente observada na mucosa e submucosa do jejuno e íleo. Em casos mais avançados, as lesões se estendem desde o duodeno até o reto. Há severa infiltração da mucosa e lâmina própria do intestino por macrófagos, células epitelioides, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e, ocasionalmente, neutrófilos e eosinófilos, com grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes, observados através da técnica de Ziehl-Neelsen (DRIEMEIER et al., 1999; YAMASAKI, 2010; DALTO et al. 2012). No fígado, pode haver atrofia hepatocelular por caquexia e microgranulomas multifocais. As lesões vasculares incluem degeneração e calcificação nas túnicas íntima e media das artérias (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007; DALTO, 2011).

2.8. DIAGNÓSTICO

Existem diversas técnicas diagnósticas para PTB e podem ser divididas em métodos confirmatórios da enfermidade no animal morto e métodos de detecção em animais vivos infectados (GOMES et al., 2002). As principais técnicas confirmatórias de PTB no animal morto incluem os achados macroscópicos de necropsia, a histopatologia, a demonstração de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen, provas de imunohistoquímica (COELHO et al., 2008; YAMASAKI et al., 2013b), cultivo bacteriológico (GOMES et al., 2002) e reação em cadeia de polimerase (PCR) (WHITTINGTON et al., 1998; SHIN et al., 2004).

O diagnóstico da doença subclínica é difícil, devido a baixa sensibilidade dos testes desenvolvidos até agora. Os exames imunológicos podem não identificar todos os animais infectados, gerando falso negativos (COUSSENS, 2004). Isso é especialmente verdade na fase inicial da doença, quando imunoglobulinas específicas são produzidas em quantidades indetectáveis (SHIN et al., 2004, LILENBAUM et al., 2007). Dos métodos sorológicos, ELISA e Imunodifusão em Gel de agarose (AGID) são considerados os testes para a detecção de animais infectados (COLLINS, 1996; STABEL, 1998). 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; VAN MAANEN et al., 2002), e por apresentar sensibilidade e especificidade elevadas para a identificação de anticorpos sanguíneos anti- *Mycobacterium avium* (subsp.) *paratuberculosis*, além de ser capaz de detectar a doença subclínica (MICHEL; BASTIANELLO, 2000), o que tem proporcionado o uso em animais a partir de dois anos de idade com bons resultados (EUROPEAN COMMISSION, 2000).

O teste de imunoistoquímica (IHQ) tem sido utilizado por diversos pesquisadores no intuito de confirmar a infecção por *Map* (DALTO et al., 2012; MOMOTANI et al., 2012; YAMASAKI et al., 2013). Uma das vantagens da IHQ está relacionada à elevada sensibilidade em relação à técnica de Ziehl Neelsen e “in situ hibridization” (PAOLICCHI et al., 2001) para detecção de *Map*, o que confere a maior acurácia ao teste, principalmente, em casos contendo poucas micobactérias. Yamasaki et al. (2013b) realizaram pesquisa de *Map* através da imunohistoquímica em amostras de linfonodos mesentéricos e íleo de animais subclínicos, coletadas em matadouro. A presença “in situ” do agente infeccioso e ou antígeno pesquisado, proporciona maior confiabilidade ao teste, minimiza as possibilidades de diagnóstico falso-positivo devido às imunorreações inespecíficas e pode auxiliar na compreensão da patogênese (YAMASAKI et al., 2013b).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* é uma micobactéria cultivável que apresenta crescimento lento (GOMES et al., 2002). Os meios de cultivo comumente utilizados para o isolamento de *Map* são Herrold egg yolk medium (HEYM), meio de Dubbos modificado, Middlebrook e Löwenstein-Jensen acrescidos de micobactina (OIE, 2012). Apesar de o cultivo bacteriano ser considerado pela OIE, o teste *gold standard*, a sensibilidade varia entre 50% e 70%, quando o isolamento é feito a partir de amostras fecais de bovinos (STABEL, 1997; COLLINS, 1996; TIMMS et al., 2011), desta forma, as taxas de prevalência podem estar subestimadas quando determinadas por esta técnica.

Atualmente, testes baseados na PCR (*polymerase chain reaction*) e *real time* 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 (TIMMS et al., 2011). A realização do diagnóstico de paratuberculose através de PCR utilizando IS900 têm demonstrado resultados satisfatórios e rápidos. Além disso, a região é recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012). Ravva e Stanker (RAVVA; STANKER, 2005) mostraram que esta região é específica para *Map*, sendo capaz de diferenciar a bactéria das demais do complexo *Mycobacterium avium*.

2.9. TRATAMENTO

Não existem antimicrobianos que apresentem resultados eficientes para o tratamento de PTB e, em muitos países, sua utilização em animais afetados pela doença é proibida. Os medicamentos antibacterianos existentes diminuem os sinais clínicos e a excreção de *Map* nas fezes, mas não são capazes de eliminar completamente a infecção (GOMES et al., 2002). Além disso, o tratamento é considerado antieconômico, pois tem custo elevado devido ao longo período que deve ser empregado, o que na maioria dos casos, superaria o próprio custo do animal (LARSEN et al., 1975).

2.10. CONTROLE E PROFILAXIA

Controlar paratuberculose é muito difícil devido ao longo período de incubação e a complicada identificação dos animais infectados subclínicamente (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007).

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

Testar todos os animais antes das aquisições pode evitar a compra de portadores de *Map* (CHIODINI et al., 1984; STABEL, 1998). Vacinação pode ser realizada em alguns países e tem apresentado bons resultados e é amplamente recomendada em propriedades com prevalência elevada de PTB (KORMENDY, 1994; HARRIS; BARLETA, 2001), porém sua grande desvantagem é a interferência nos resultados de testes imunológicos, o que inviabiliza tanto a detecção de animais infectados por *Map* (fontes de infecção) quanto por tuberculose bovina (MUSKENS et al., 2002). A interferência na resposta imune gerada pela vacinação inviabiliza sua utilização em países que possuem planos de erradicação de tuberculose como o Brasil (LILENBAUM, 2000). Dessa forma, um programa que inclua testes periódicos dos animais, que visa identificar os soropositivos para evitar o contato com os bezerros e o uso de colostro contaminado é a forma mais importante de controle da enfermidade (STABEL, 1998; RADOSTITS et al., 2002).

2.11. POTENCIAL ZOONÓTICO (DOENÇA DE CROHN)

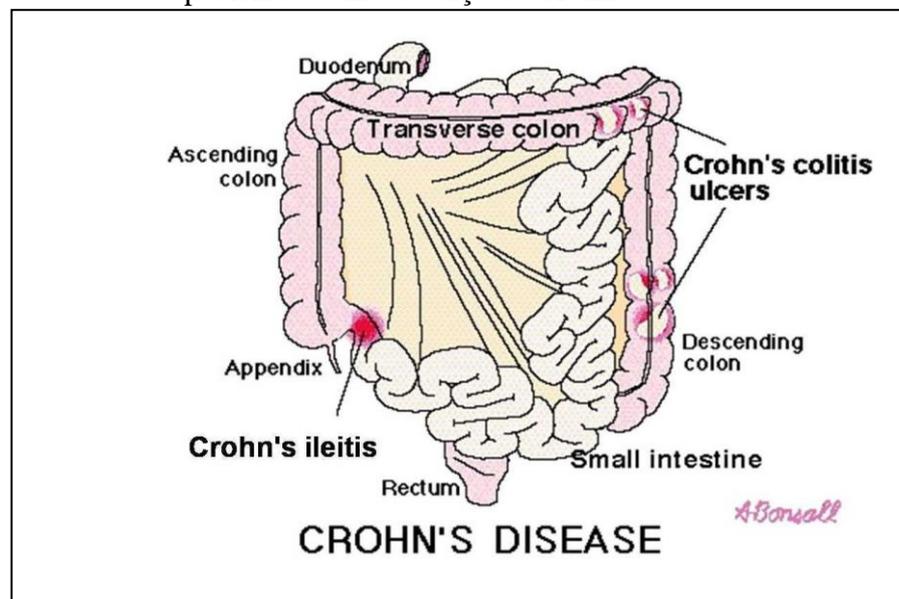
A doença de Crohn é uma enterite granulomatosa que acomete o ser humano, muito semelhante à paratuberculose. Os pacientes infectados apresentam diarreia e perda de peso

crônicas, com lesões teciduais graves no epitélio intestinal. Pacientes com idades entre 15 e 30 anos são os mais frequentemente reportados (COTTONE et al., 1995).

Similaridades entre a paratuberculose e a doença de Crohn foram observadas por Dalziel em 1913 e posteriormente por Crohn et al. em 1932. Várias teorias sobre a etiologia da doença têm sido sugeridas ao longo dos anos, mas o agente etiológico ainda é desconhecido, no entanto, evidências apontam para uma interação entre um estímulo ambiental persistente, como um antígeno microbiano e fatores genéticos que regulam a resposta imunológica ou a função da mucosa intestinal (SHANAHAN; O'MAHONY, 2005).

As lesões são frequentemente segmentares, com espessamento da parede do intestino devido ao edema e inflamação da submucosa; pacientes com lesões no íleo apresentam sinais clínicos de enterite e perda de peso progressiva semelhantes à apendicite aguda, já pacientes com lesões em cólon desenvolvem dores abdominais, diarreia e frequentemente hemorragia (Figura 2). As alterações causadas pela inflamação geralmente provocam acentuada fibrose que leva à estenose intestinal e ulceração que progride até a formação de fistulas (WAKEFIELD et al., 1991).

Fig. 2. Esquema indicando as porções intestinais comumente afetadas em pacientes com a doença de Crohn



Fonte: Yamasaki, 2010

A doença de Crohn possui similaridades patológicas com a forma tuberculoide (paucibacillary) da paratuberculose no que diz respeito às alterações crônicas granulomatosas não caseosas das lesões que acometem a parede intestinal e tecidos linfoides adjacentes. No

entanto, ulceração e fistulação não são típicas da paratuberculose em bovinos; acredita-se que o agente pode provocar diferentes graus de reação nas diferentes espécies (CLARKE, 1997). Vale ressaltar ainda, que há relatos da ocorrência de úlceras em alguns poucos estudos de infecção experimental em bovinos (TAYLOR, 1953). Histologicamente, as lesões da doença de Crohn são caracterizadas por granuloma não caseoso, com a presença de agregados de células epitelioides, células gigantes de Langhans e linfócitos, que se infiltram da mucosa até a serosa.

A análise histopatológica de material de biópsia frequentemente mostra granulomas difusos e alterações ganglionares semelhantes aos da PTB bovina (SCHMITZ-MOORMANN et al., 1984). BAAR são encontrados, por vezes, em granulomas de pacientes de Crohn e métodos imunohistoquímicos apresentaram resultado positivo em algumas amostras (KOBAYASHI et al., 1989). Em cultivos de biópsias intestinais, tem sido isoladas colônias de *Map* (CHIODINI; ROSSITER, 1996). Estudos com PCR utilizando o IS900, também apresentaram amplificação da bactéria em amostras intestinais de humanos (CHIBA et al. 1998)

Alguns autores consideram a doença de Crohn como uma zoonose (CHIODINI et al., 1984; CHIODINI; ROSSITER, 1996; HERMON-TAYLOR; BULL, 2002); portanto, alimentos como leite e carne de bovinos podem ser fontes de infecção (SWEENEY et al., 1996; STABEL et al., 1997; COLLINS, 1997). É necessário um estudo epidemiológico amplo para desvendar a real causa da doença de Crohn e determinar se *Map* tem significado etiológico primário ou se é apenas um invasor secundário (CLARKE, 1997).

REFERÊNCIAS

- ACYPRESTE, C.S. et al. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 55-59, 2005.
- ALIBASOGLU M. et al. Naturally occurring arteriosclerosis in cattle infected with Johne's disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 49-57, 1962.
- BANNANTINE, J.P.; BERMUDEZ, L.E. No Holes Barred: Invasion of the Intestinal Mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 3960-3965, 2013.
- BARBOSA, J.D. et al. Paratuberculosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Maranhão, Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 26, 2010, Santiago- Chile. **Anais ...**, 2010, v. 1, p.141-142.
- BELO REIS, A.S. et al. Paratuberculose bovina no estado do Pará. In: X Congresso Brasileiro de Buiatria, 2013, Belém- Brasil. **Anais...**, 2013, CD.
- BELO REIS, A.S. et al. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 35, n. 10, p. 823-828, 2015.
- BELO REIS, A.S. et al. Intrauterine infection from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, vol. 5, n. 1, p. 1-3, 2016.
- BRITO M.F. et al. Paratuberculose em búfalos no Nordeste do Brasil. **Tropical Animal Health and Production**, 2015. (Em publicação).
- BUERGELT C.D. et al. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. **Veterinary Pathology**, v. 15, p. 196-207, 1978.
- BUERGELT C.D. et al. Nested-polymerase chain reaction in prenatal detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) in bovine allantoic fluid and fetuses. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 3, p. 232-238, 2006.
- CARRIGAN, M.J.; SEAMAN, J.T. The pathology of Johne's disease in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, p. 47-50, 1990.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988, 249p.
- CARVALHO, I.A. Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa – MG. 2008. Minas Gerais. 72p. **Dissertação**. (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, 2008.

CARVALHO I.A. et al. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health and Production**. S11250-012-0117-1. 2012. (Online)

CHIBA, M. et al. No *Mycobacterium paratuberculosis* detected in intestinal tissue, including Peyer's patches and lymph follicles, of Crohn's disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 33, p. 482-487, 1998.

CHIODINI, R.J. Abolish *Mycobacterium partuberculosis* strain 18. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1956-1957, 1993.

CHIODINI, R.J. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease enterities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 90-117, 1989.

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.

CHIODINI, R.J.; ROSSITER, C.A. Paratuberculosis a potential zoonosis? **Veterinary Clinics of North America**. v. 12, n. 2, p.457-467, 1996.

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

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

COELHO, A.C. et al. Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1097-1102, 2008.

COLLINS, M.T. Diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice**, v. 12, p. 357-371, 1996.

COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 3445-3448, 1997.

COTTONE, M. et al. Epidemiology and pathogenesis of crohn's disease. **Chirurgia Italiana**. v. 47, n. 5, p. 1-7. 1995.

COUSSENS, P.M. Minireview: Model for Immune Responses to *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Cattle. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3089-3096, 2004.

CROHN, B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. Regional ileitis, a pathological and clinical entity. **Journal of the American Medical Association**, v. 99, p. 1323-1329, 1932.

CUNHA, P.H.J. et al. Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 2003. Botucatu. **Anais...** Botucatu [s.n], 2003, p.118.

- 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.G.C. Achados clínicos e patológicos de paratuberculose em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul – Brasil. 2011. Rio Grande do Sul. 62p. **Dissertação**. (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- DALTO, A.C. et al. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 1-5, 2012.
- DALZIEL, T. K. Chronic interstitial enteritis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1068-1079, 1913.
- DESIO, G. et al. Estimated prevalence of Johne's disease in herds of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the province of Caserta. **Italian Journal Animal Science**, v.12, n. 8, p. 48-52, 2013.
- DIAS, L.D. et.al. Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose. In: SEMANA DE INICIACAO CIENTIFICA UFMG, 11, 2002, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: [s.n], 2002, CD ROM.
- DRIEMEIER, D. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 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. et al. Paratuberculose bovina em fazenda de produção leiteira em Resende, Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, 2003. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s. n.], 2003. CD-ROM.
- FERREIRA, R. et al. 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, L. et al. Paratuberculose em bovinos de corte na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 437-442, 2015.
- 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.
- 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.
- HAGAN, W.A. Age as factor in susceptibility to Johne's disease. **Cornell Veterinarian**, v. 28, p. 34-40, 1938.

HARRIS, N. B.; BARLETA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 3, p. 489-502, 2001.

HERMON-TAYLOR, J.; BULL, T.J. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, p. 3-6, 2002.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J.; KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 12, p. 735-740, 1997.

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

KHOL, J.L.; et al. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a Breeding Bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative Real-Time PCR and culture examinations. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 10, p. 1283-1288, 2010.

KOBAYASHI, K.; BLASER, M.J.; BROWN, W.R. Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 96, p. 1009-1015, 1989.

KORMENDY, B. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 117-125, 1994.

KREEGER, J.M. Ruminant paratuberculosis: a century of progress and frustration. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 373-382, 1991.

LAMBETH C. et al. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 8, p. 504-508, 2008.

LAMBRECHT, R. S.; COLLINS, M. T. *Mycobacterium paratuberculosis*: factors that influence mycobactin dependence. **Diagnosis in Microbiology and Infections Diseases**, v. 15, 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.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. Uma mini-revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 169-171, 2000.

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

MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.T. History of paratuberculosis. In: BEHR, M.A.; COLLINS, D.M. **Paratuberculosis: organism, disease, control**. 2010, p. 1-9, cap. 1.

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, n. 5, p. 796-801, 1987.

MEDEIROS, J.M.A. et al. Paratuberculose em caprinos e ovinos no estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-115, 2012.

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

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2011. Rebanho bubalino brasileiro: Efetivo por Unidade de Federação. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 22 de jun. de 2014.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2014. Dados do rebanho bovino e bubalino no Brasil 2014. Disponível em <[www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados de rebanho bovino e bubalino do Brasil 2014.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil%202014.pdf)>. Acesso em 28 out. 2015.

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

MOMOTANI E. et al. Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 148, p. 55- 58, 2012.

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.

MOTA, P.M.P.C. et al. Paratuberculosis n 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. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 74, n. 2, p. 73-79, 2007.

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.

NAKAJIMA, M.; MAIA, F.C.L.; MOTA, P.M.P.C. Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO EM MICOBACTÉRIAS, 4, 1991, Bauru. **Anais...** Bauru: [s.n], 1991. Resumo 67.

OIE. World Organization for Animal Health. Terrestrial Manual 2008. Chapter 2.1.11. - Paratuberculosis (Johne's disease). 276-291.

OIE 2012. World Organization for Animal Health. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf> Acessado em 16/03/2015.

OLIVEIRA, D.M. et al. Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba. In: ENCONTRO NACIONAL DO DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 5, 2003, Mato Grosso do Sul. 2008. **Anais...** Mato grosso do Sul: [s.n.], 2008. CD-ROM.

OLIVEIRA, D.M. et al. Paratuberculose em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2010.

PAOLICCHI F.A. et al. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): An immunohistochemical study. **Journal Veterinary Medicine**, v. 48, p. 313-320, 2001.

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

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

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

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica veterinária**. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

RAVVA, S.V.; STANKER, L.H. Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. **Journal Microbiology Methods**, v. 63, n. 3, p. 305-317, 2005.

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.

RIET-CORREA, F.; DRIEMEIER. Paratuberculose. In: RIET-CORREA, F. SCHILD, A.L. LEMOS, R.A.A. & BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3ª ed. Vol. 2. Santa Maria: Pallotti. 2007.

RISTOW, P. et al. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 432-434, 2006.

RIVEIRA, F.E.B. Levantamento sorológico utilizando-se a técnica ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose. In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL. 1996. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: [s.n.], 1996. p. 20-22.

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

SCHMITZ-MOORMANN, et al. The granulomatin Crohn's disease. A bioptical study. *Pathology, Research & Practice*, v. 178, p. 467-476, 1984.

SEITZ, S.E. et al. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal American Veterinary Medicini Association*, v. 194, p. 1423-1426, 1989.

SHANAHAN, F.; O'MAHONY, J. The mycobacteria story in crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, v. 100, n. 7, p. 1537-1538, 2005.

SHIN, S.J. et al. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 16, p. 116-120, 2004.

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.

SILVA, N.M.; PIZELLI, G.N. Estudos sobre a paratuberculose. I: diagnóstico de um caso da doença. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v. 4, p. 169-173, 1961.

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).

SIVAKUMAR, P. et al. Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Pathology*, v. 43, n. 4, p. 455-62, 2006.

STABEL, J.R. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, n. 4, p. 375-380. 1997.

STABEL, J.R. Johne's: a hidden threat. *Journal 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.

SWEENEY, R.W.; WHITTLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A.E. *Mycobaterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 166-171, 1992.

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. Experimental Johne's disease in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 63, p. 355-367, 1953.

THOREL, M.F. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent Mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* subsp. nov. , *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. , and *Mycobacterium*

avium subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 3, p. 254-260, 1990.

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

VAN MAANEN, C. et al. 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.**

WAKEFIELD, A.J. et al. Granulomatous vasculitis in Chron's disease. **Gastroenterology**, v. 100, p. 1279-1287, 1991.

WHITTINGTON, R.J. et al. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spike environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 701-707, 1998.

WHITTINGTON, R.J.; WINDSOR, P.A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 60-69, 2007.

WOLF, J.L.; BYE, W.A. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. **Annual Review Medicine**, v. 35, p.95-112, 1984.

YADAV, D. et al. Pathogenic 'Bison-type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. **Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 373-387, 2008.

YAMASAKI, E.M. Aspectos clínico-patológicos da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro no município de Rio Claro, RJ. 2010. Rio de Janeiro. 100p. **Dissertação.** (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

YAMASAKI, E.M. et al. Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 921-932, 2010.

YAMASAKI, E.M. et al. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 127-140, 2013a.

YAMASAKI, E.M. et al. Diagnóstico imuno-histopatológico da paratuberculose subclínica em bovinos no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1427- 1432, 2013b.

3. ARTIGO 1 - DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSE POR BIÓPSIA RETAL EM BÚFALOS¹

Obs.: o artigo segue as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira e foi publicado neste periódico.

Alessandra S. Belo Reis², Marilene F. Brito³, Pedro S. Bezerra Júnior², Antônio A. Fonseca Júnior⁴, Daniel G. Ubiali³, Rinaldo A. Mota⁵, Rômulo C. Leite⁶ e José D. Barbosa^{2*}

ABSTRACT.- Belo Reis A.S., Brito M.F., Bezerra Jr P.S., Fonseca Jr A.A., Ubiali D.G., Mota R.A., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. [**Paratuberculosis diagnostic to biopsy rectal in buffaloes.**] Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(10):823-828. Central de Diagnóstico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Campus Castanhal, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Castanhal, PA 68740-080, Brazil. E-mail: diomedes@ufpa.br

Paratuberculosis in a herd of buffaloes was studied in the municipality of São Mateus, Maranhão, Brazil. Rectal biopsies were performed in 140 male and female Murrah, Mediterranean and crossbreed buffaloes older than 3 years. Postmortem examination of 11 buffaloes was performed to compare the rectal biopsies with possible lesions in mesenteric nodes and the intestine. The history of the herd and clinical examination revealed progressive weight loss and non-responsive antimicrobial diarrhea, dehydration and submandibular edema. Rectal biopsies showed in six buffaloes microscopically suggestive lesions for paratuberculosis through hematoxylin-eosin staining (HE), characterized by moderate multifocal granulomatous enteritis with epithelioid cell infiltration. In four buffaloes Langhans giant cells were found. In 15 buffaloes lymphocytic infiltrate was observed in the

¹ Recebido em 28 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 26 de outubro de 2015.

² Central de Diagnóstico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Centro, Castanhal, PA 68740-080, Brasil. *Autor para correspondência: diomedes@ufpa.br

³ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

⁴ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Pedro Leopoldo, MG 36000-000, Brasil.

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

⁶ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil.

lamina propria of the large intestine. Ziehl-Neelsen staining (ZN) revealed in 4.3% (6/140) acid-fast bacilli in the rectal mucosa. Real time PCR amplified to 5% (7/140) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) DNA. 11 buffalos were submitted to postmortem examination, gross examination revealed augmented mesenteric nodes with whitish areas in the cut surface. The mucosa of the small intestine was irregular and thickened, with evident traverse folds and Peyer plates. The brownish intestinal content was fluid, the ileocecal valve area thickened and edematous with evident lymphatic vessels. Histological lesions in the mesenteric lymph node and small intestine four buffalo were compatible with those already described in the literature, and presented acid-fast bacilli by ZN staining and amplification of *Map* genetic material in qPCR. The concordance between the rectal biopsy and the postmortem samples was in agreement with the Kappa test ($K=0.792$) and was considered substantial or high. The rectal biopsy showed to be promising and can be used by practitioners, together with other techniques, for antemortem diagnosis in buffalo herds suspected to be affected by paratuberculosis. Samples obtained by rectal biopsy were suitable for ZN staining and real time PCR. Rectal biopsy can be used as a tool for diagnosis and control of Johne's disease in buffaloes to select and eliminate positive animals within the herd and decrease gradually the spread of *Map*.

INDEX TERMS: Diagnosis, Johne's disease, paratuberculosis, rectal biopsy, buffaloes, Brazil.

RESUMO.- Foram realizadas biópsias retais de 140 búfalos, machos e fêmeas, das raças Murrah e mestiços de Murrah com Mediterrâneo, com idade acima de três anos, em uma propriedade no município de São Mateus, Maranhão, Brasil. Adicionalmente foram realizadas necropsias de 11 búfalos, para realizar um estudo comparativo entre os achados das biópsias retais e de tecidos de íleo e linfonodo mesentérico. A propriedade apresentava histórico de animais com emagrecimento progressivo e diarreia não responsiva a antimicrobianos. Os búfalos apresentavam sinais clínicos caracterizados por diarreia, estado nutricional regular a ruim, desidratação e edema submandibular. Nas biópsias retais seis búfalos apresentaram lesões sugestivas da paratuberculose na Hematoxilina-Eosina (HE), sendo estas caracterizadas por inflamação granulomatosa multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides. Em quatro animais foram observadas adicionalmente células gigantes do tipo Langhans. Em 15 búfalos foi observado infiltrado linfocitário multifocal leve na lâmina própria. Pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), 4,3% (6/140) apresentaram bacilos álcool-

ácido resistentes (BAAR) e na PCR em tempo real (qPCR), 5% (7/140) tiveram amplificação do material genético. Foram necropsiados 11 búfalos, à necropsia foram observados aumento de linfonodos mesentéricos com áreas esbranquiçadas na superfície de corte; intestino delgado e grosso com dobras transversais evidentes, mucosa espessada e irregular, de aspecto reticulado, placas de Peyer evidentes e conteúdo líquido e marrom. Ainda se viam áreas espessadas em torno da válvula ileocecal e vasos linfáticos evidentes. As lesões histológicas localizadas no intestino delgado e linfonodos mesentéricos de quatro búfalos foram compatíveis com lesões já descritas na literatura, e apresentaram BAAR e amplificação de material genético na qPCR. A concordância entre a biópsia retal e a análise dos tecidos de íleo e linfonodo mesentérico, segundo o teste Kappa ($K=0,792$), foi alta. A biópsia retal realizada demonstrou ser promissora e pode ser empregada, juntamente com outras técnicas, para auxiliar no diagnóstico *ante mortem* em búfalos de rebanhos com suspeita de paratuberculose; pela mesma foi possível detectar animais positivos através da coloração de ZN e qPCR. Os resultados obtidos podem ser utilizados no controle da enfermidade para selecionar e eliminar animais positivos do rebanho, diminuindo gradualmente, a disseminação do agente no ambiente, e a consequente contaminação de outros animais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Diagnóstico, doença de Johne, paratuberculose, biópsia retal, búfalos, Brasil.

INTRODUÇÃO

Paratuberculose ou doença de Johne é uma enterite granulomatosa, crônica, infecciosa, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), que acomete mamíferos, principalmente ruminantes domésticos e selvagens, e causa diarreia, síndrome de má absorção e perda de peso (Chiodini et al. 1984, Riet-Correa & Driemeier 2007, Mota et al. 2010). A infecção se dá pela ingestão de colostro, leite ou água contaminados com fezes.

A enfermidade tem distribuição mundial e a doença clínica foi descrita pela primeira vez em 1895 por Johne e Frothingham na Alemanha (Manning & Collins 2010). No Brasil, a doença foi diagnosticada em búfalos por Mota et al. (2010) em Pernambuco, Barbosa et al. (2010) no Maranhão, Dalto (2011) no Rio Grande do Sul e Brito (2015) em Alagoas.

As perdas econômicas verificadas em função da infecção subclínica se devem à redução da conversão alimentar, diminuição da produtividade, redução dos níveis de proteína e

gordura no leite, perda de peso ao abate, alta incidência de mastite e diminuição da fertilidade (Clarke 1997, Yamasaki et al. 2010).

O diagnóstico *ante mortem* da doença tem sido um ponto crítico em estratégias de controle. Ainda não há um teste padrão para o diagnóstico da paratuberculose devido à natureza crônica da enfermidade e aos diferentes estágios da doença (OIE 2014). Na paratuberculose as lesões localizam-se principalmente no trato intestinal e linfonodos mesentéricos; no intestino grosso são observadas lesões da mesma natureza, porém menos extensas (Driemeier et al. 1999, Mota et al. 2010); também foram relatadas lesões na mucosa retal em búfalos (Dalto et al. 2012).

Dalto et al. (2012) realizaram uma biópsia em um búfalo no Rio Grande do Sul e sugeriram que este exame poderia ser mais uma ferramenta para confirmação do diagnóstico de paratuberculose nesta espécie, visto que no fragmento analisado pelos autores, havia BAAR e marcação positiva na Imunoistoquímica (IHQ). Baseado nesta informação optou-se pela continuação deste estudo. Desta forma o objetivo deste trabalho é avaliar o uso da biópsia retal como diagnóstico *ante mortem* da paratuberculose em búfalos, quando comparada a outras técnicas de diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Biópsia retal. Foram realizadas 140 biópsias em búfalos adultos, acima de três anos, com escore corporal (EC) de 1 a 3 (escala de 1-5). Onze animais que apresentavam sintomatologia sugestiva de paratuberculose foram necropsiados. O estudo foi conduzido em uma propriedade localizada no município de São Mateus, MA, onde já havia confirmação de casos de paratuberculose (Barbosa et al. 2010). Durante as visitas à propriedade, foram coletados dados referentes ao histórico e sinais clínicos.

Foram coletados dois fragmentos envolvendo a mucosa e submucosa do reto de cada animal, de aproximadamente 0,6cm, cranial ao orifício anal, com auxílio de uma pinça Mathieu de 45cm utilizada para biópsia. A coleta foi realizada com uso de luvas de palpação e luvas descartáveis para procedimentos, e a cada coleta, a pinça era higienizada e esterilizada. O primeiro fragmento foi coletado para Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR) e o segundo para a histopatologia (Fig.1A-C). Os fragmentos para histopatologia foram fixados em formol a 10% tamponado e processados pelos métodos usuais para exame histológico, embebidas e incluídas em parafina, cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina e eosina (HE), e em animais com lesões sugestivas de PTB, cortes adicionais foram corados

pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN). As amostras foram processadas no laboratório de patologia da Universidade Federal do Pará.

O fragmento destinado para qPCR foi armazenado em tubos de polietileno tipo *eppendorf* e mantidos a -20°C para posterior processamento. A extração de DNA do fragmento foi realizada por Kit comercial da Qiagen (QIAamp[®] DNA Mini Kit para tecidos). A reação de qPCR foi realizada usando os *Primers* e sondas para o gene IS900 (F-5'-TGCTGATCGCCTTGCTCA-3' e R-5'-GGGCCTGATCGGCGATGAT-3'; S-5'-FAM-CCGGGC AGC GGC TGC TTT ATA TTC-3'-BHQ1) (Sigma[®]); e os *Primers* e sondas para F57 (F-5'-TTCATCGATACCCAAACTCAGAGA-30 e R-5'-GTTCGCCGCTTGAATGGT-3'; S-5'-Cy5-5'-TGCCAGCCGCCCACTCGTG-3'-BHQ2) (Sigma[®]) (Irengue et al. 2009). Na reação foram utilizados 2 μl de solução de DNA, 12,5 μl do Mix (RealQ-PCR-RT dUTP-UNG Master Mix kit) (Ampliqon, Dinamarca), *Primers* na concentração de 0,6 pmol/ μl e sondas na concentração de 0,4 pmol/ μl , 0,5 μl de H₂O e 2 μl de MgCl₂ (50nM) (Invitrogen[®]), num volume total de reação de 25 μl . A reação foi iniciada a 50°C durante 2 minutos, e 95°C , durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C , durante 15 segundos, anelamento/extensão a 60°C durante 1 minuto. Cada amostra foi testada em triplicata no termocilador *LightCycler* 480 (Roche, Alemanha) de análise de dados.

Necropsia. Onze animais que apresentavam sintomatologia clínica sugestiva de paratuberculose foram necropsiados na fazenda em estudo. Os animais foram submetidos à eutanásia conforme prescrição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA 2008). Foram coletados, de cada búfalo, fragmentos de íleo e linfonodo mesentérico para a realização da HE, ZN e qPCR. O armazenamento e o processamento das amostras foram iguais ao descrito para as biópsias retais.

Estatística. Para avaliar a concordância entre as biópsias retais e as análises de tecidos das necropsias, utilizou-se o Teste de KAPPA, avaliando-se as escalas categóricas em relação aos testes laboratoriais (Biópsia retal e análise de tecidos) (Siegel & Catellan 1988).

RESULTADOS

Na propriedade havia 1000 búfalos adultos (acima de 3 anos), das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços. Os búfalos eram criados de forma extensiva em pastagens de *Brachiaria* spp. e pastagens nativas. O histórico obtido na propriedade era que os animais apresentavam sinais de emagrecimento e diarreia, não respondiam aos antimicrobianos e a evolução da doença variava entre quatro e oito meses. Segundo os tratadores, cerca de cinco animais com esses sinais clínicos morriam por ano.

Sinais clínicos. Em 15% (21/140) dos búfalos foram observados sinais clínicos caracterizados por estado nutricional regular a ruim, diarreia líquida, desidratação e edema submandibular (Quadro 1).

Biópsia retal. Em seis búfalos (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141 e 188) foram observadas lesões sugestivas da paratuberculose na HE, sendo estas caracterizadas por inflamação granulomatosa multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides. Em quatro animais foram observadas adicionalmente células gigantes do tipo Langhans (Búfalos 2, 139, 141 e 188) (Fig.2) (Quadro 1). Em 15 búfalos foi observado infiltrado linfocitário multifocal leve na lâmina própria. No Ziehl-Neelsen, 4,3% (6/140) dos búfalos apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141 e 188) e na qPCR, 5% (7/140) tiveram amplificação do material genético (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141, 188 e 189) (Quadro 1).

Achados anatomopatológicos. Nos 11 animais necropsiados foram observados aumento de linfonodos mesentéricos, leve (Búfalos 53, 118, 138, 177 e 187), moderado (Búfalos 52 e 137) e acentuado (Búfalos 139, 186, 188 e 189), mucosa do intestino delgado e grosso espessada, irregular, de aspecto reticulado e com dobras transversais evidentes (Búfalos 137, 139, 186, 188 e 189); conteúdo líquido e marrom. Áreas espessadas em torno da válvula ileocecal (Búfalos 137, 139, 186, 188 e 189), vasos linfáticos evidentes (Búfalos 137, 139, 188 e 189), áreas esbranquiçadas na superfície de corte dos linfonodos mesentéricos (Búfalos 137, 188 e 189) e placas de Peyer evidentes (Búfalo 186).

Dos 11 búfalos necropsiados, apenas quatro (Búfalos 139, 186, 188 e 189) apresentaram lesões de paratuberculose. As lesões histológicas localizadas no intestino delgado foram caracterizadas por infiltrado inflamatório granulomatoso rico em células gigantes na mucosa e infiltrado mononuclear na submucosa. Nos linfonodos mesentéricos foram observadas células epitelioides e células gigantes na região cortical e medular.

Os fragmentos de intestino e linfonodos mesentéricos dos Búfalos 186, 188 e 189 foram positivos na coloração de ZN. O Búfalo 139 foi positivo somente no intestino e negativo no linfonodo mesentérico.

Na qPCR foram positivos fragmentos de íleo e linfonodos mesentéricos dos Búfalos 186, 188 e 189 e o Búfalo 139 foi positivo em fragmento do íleo e negativo em fragmento de linfonodo mesentérico (Quadro 2).

Estatística. O coeficiente Kappa foi 0,792 que demonstra uma concordância alta entre a biópsia retal e a análise dos tecidos de íleo e linfonodo mesentérico (Quadro 3).

DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados nos búfalos deste estudo foram semelhantes aos encontrados por Mota et al. (2010), Dalto et al. (2012) e Brito (2015) em búfalos com paratuberculose. A diarreia ocorre devido à má absorção de nutrientes, em função da enterite granulomatosa, o que justifica a perda progressiva de peso e o mau estado corporal dos animais afetados (Chiodini et al. 1984). O edema submandibular pode estar presente; este achado foi descrito por Dalto (2011) em búfalos no Rio Grande do Sul, achado que pode ser relacionado à diarreia crônica e também pela má absorção intestinal (Clarke 1997, Driemeier et al. 1999); no entanto no presente trabalho, apenas um búfalo que apresentava edema submandibular foi positivo para a enfermidade. À medida que a diarreia aumenta, o edema tende a desaparecer e o animal pode apresentar desidratação e debilidade (Radostits et al. 2007). Como apenas sete animais, dos 21 que apresentavam sinais clínicos sugestivos de paratuberculose, foram positivos, se faz necessário o diagnóstico diferencial desta enfermidade com outras que cursam com diarreia, caquexia e edema submandibular (Radostits et al. 2007, Yamasaki et al. 2010).

Os achados histológicos observados nos búfalos do presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Driemeier et al. (1999) e Yamasaki et al. (2010) em bovinos, e por Mota et al. (2010) em búfalos, tais como infiltração da mucosa e lâmina própria por macrófagos, linfócitos, células epitelioides e células gigantes. Segundo esses autores podem ser ainda visualizados plasmócitos e, ocasionalmente, neutrófilos e eosinófilos. Dalto et al. (2012) também realizaram análise da mucosa retal em um búfalo e verificaram lesões neste segmento, presença de BAAR e marcação positiva na IHQ. Esses achados foram semelhantes aos observados nos búfalos deste estudo, que tiveram lesões sugestivas de paratuberculose, presença de BAAR e PCR positivo, tanto nas amostras das biópsias retais como da análise de íleo e linfonodo mesentérico obtidos na necropsia.

Na biópsia retal apenas um búfalo apresentou qPCR positivo (189) e ausência da bactéria no teste de ZN. Quando a carga bacteriana é baixa, os bacilos podem não ser detectados ao exame histológico, o que poderia explicar o resultado negativo à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e positivo na qPCR (Zimmer et al. 1999). Isso também pode ser justificado pelo segmento analisado, que segundo Mota et al. (2010) e Dalto et al. (2012), nesta região, podem

ser visualizadas lesões leves, e que geralmente a carga bacteriana é mais baixa. Apenas um búfalo não apresentava sinais clínicos, mas foi positivo em ambos os testes (Búfalo 2). Os animais subclínicos, portadores e prováveis eliminadores da bactéria são fontes de infecção para outros animais, e representam um desafio para o diagnóstico, o que dificulta o controle da enfermidade; estima-se que para cada animal infectado, há de 15 a 25 ruminantes subclínicos no rebanho (Radostits et al. 2007). Através da biópsia retal, foi possível detectar um animal subclínico no rebanho.

A concordância entre a biópsia retal e a análise dos tecidos de íleo e linfonodo mesentérico, segundo o teste Kappa ($K=0,792$) foi considerada alta. Apenas um animal foi negativo na análise de biópsia retal e positivo nos tecidos das necropsias. Animais em estágios iniciais da enfermidade, geralmente apresentam lesões leves e localizadas principalmente nas porções de íleo, que com a evolução da enfermidade, se estende até o reto (Mota et al. 2010, Dalto et al. 2012). Exames histológicos e PCR em tecidos já foram realizados por Sivakumar et al. (2005) e Mota et al. (2010) em búfalos com paratuberculose e esses autores demonstraram que a pesquisa em amostras de tecido pode ser realizada e que apresenta resultados satisfatórios, assim como observado no presente trabalho. Com base nesses resultados, a biópsia retal mostrou-se eficiente para detecção de animais positivos e negativos em rebanhos onde existem casos de paratuberculose. 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 (Clark et al. 2008).

O exame histológico por meio da coloração de ZN dos tecidos é uma forma rápida e econômica para se obter o diagnóstico da PTB (Juste & Aduriz 1990). Nesse estudo, ZN foi satisfatório para a identificação de BAAR em tecidos das biópsias, de íleo e linfonodo mesentérico.

Ressaltamos ainda que, o fragmento coletado para biópsia envolvia apenas a mucosa e submucosa do reto, sem envolver a serosa, portanto não havia perfuração da alça e consequente contaminação da cavidade abdominal, o que poderia ocasionar peritonite. Não foi observado nenhum problema nos animais deste estudo referentes à coleta dos fragmentos, visto que 11 animais após a coleta foram necropsiados, e não foi visualizada perfuração da serosa, somente uma pequena área hiperêmica na região coletada.

CONCLUSÕES

A biópsia retal aplicada neste trabalho demonstrou ser promissora e pode ser empregada, juntamente com outras técnicas, para auxiliar no diagnóstico *ante mortem* em búfalos de rebanhos com suspeita de paratuberculose.

Pela biópsia foi possível detectar animais positivos para paratuberculose através da coloração de Ziehl-Neelsen e por qPCR.

A biópsia retal pode ser utilizada no controle da enfermidade para selecionar e eliminar animais positivos do rebanho, diminuindo assim, gradualmente, a disseminação de *Map* no ambiente e a infecção do rebanho.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Silveira J.A.S., Albernaz T.T., Silva N.S., Reis A.S.B., Oliveira C.H.S. & Yamasaki E.M. 2010. Paratuberculosis in water buffaloes (*Buballus bubalis*) in Maranhão State, Brazil. Anais XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile.
- Brito M.F. 2015. Comunicação pessoal (Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ).
- Chiodini R.J. & Van Kruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. 74:218-262.
- Clarke C.J. 1997. The pathology and patogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp. Pathol. 116:217-261.
- Clark Jr D.L., Koziczkowski J.J., Radcliff R.P., Carlson R.A. & Ellingson J.L.E. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. J. Dairy Sci. 91:2620-2627.
- Dalto A.G.C. 2011. Achados clínicos e patológicos de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul, Brasil. Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 62p.

- 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. 2012. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1-5.
- Driemeier D., Cruz C.E.F., Gomes M.J.P., Corbellini L.G., Loretto A.P. & Colodel E.M. 1999. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(3/4):109-115.
- Ireng L.M., Walravens K., Govaerts M., Godfroid J., Rosseels V., Huygen K. & Gala J.L. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR-RT for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol.* 136:166-172.
- Juste R.A. & Aduriz J.J. 1990. *Diagnostico. Ovis* 7:49-62.
- Manning E.J.B. & Collins M.T. 2010. History of paratuberculosis, p.2-9. In: Berhs M.A. & Collins D.M. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control.* CAB International, Cambridge. 375p.
- Mota R.A., Peixoto P.V., Yamasaki E.M., Medeiros E.S., Costa M.M., Peixoto R.M. & Brito M.F. 2010. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):237-242.
- OIE 2014. World Organization for Animal Health. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf> Acessado em 23 out. 2015.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with bacteria. IV, p.1014-1044. In: *Ibid.* (Eds), *A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats: veterinary medicine.* 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. Paratuberculose, p.329-334. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos.* Vol.2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Siegel S. & Castellan N. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences.* 2nd ed. McGraw-Hill, New York, p.284-285.
- Sivakumar P., Tripathi B.N. & Singh N. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymphnode tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.* 108:263-270.

- Zimmer K., Dräger K.G. & Klawonn W. & Hess R.G. 1999. 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.
- Yamasaki E.M, Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 33(2):127-140.
- Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. Pesq. Vet. Bras. 30(11):921-932.

Legendas das Figuras

Fig.1. (A) Realização de biópsia retal, com auxílio de uma pinça Mathieu, para o diagnóstico de paratuberculose em búfalo. (B) Fragmento coletado (seta). (C) Fragmento coletado em frasco tipo Falcon, em formol a 10%.

Fig.2. Células gigantes de Langhans na lâmina própria entre as criptas intestinais, na biópsia retal do Búfalo 2 com paratuberculose. HE, obj.40x.

Quadro 1. Sinais clínicos, achados histopatológicos, Ziehl-Neelsen e PCR em tempo real das biópsias retais de búfalos

Ordem	Búfalo no.	Escore corporal	Idade	Sinais clínicos	HE	ZN	qPCR
1	2	3	4	Sem sinais clínicos	Lesão A	Positivo	Positivo
2	3	2	5	Diarreia	Lesão B	Positivo	Positivo
3	4	2,5	5	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
4	18	2	5	Diarreia	Lesão B	Positivo	Positivo
5	35	2	5	Diarreia e edema submandibular	Lesão C	Negativo	Negativo
6	50	2	5	Diarreia e edema submandibular	Lesão C	Negativo	Negativo
7	52	1,5	5	Diarreia	Lesão C	Negativo	Negativo
8	53	2	5	Diarreia	Lesão C	Negativo	Negativo
9	118	2	17	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
10	121	4	5	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
11	137	2	8	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
12	138	2	12	Emagrecimento	SL	Negativo	Negativo
13	139	2	15	Diarreia	Lesão A	Positivo	Positivo
14	141	2	7	Diarreia	Lesão A	Positivo	Positivo
15	143	2	5	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
16	155	2,5	5	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
17	163	3	7	Diarreia	SL	Negativo	Negativo
18	177	2	10	Diarreia e edema submandibular	SL	Negativo	Negativo
19	186	2	5	Diarreia	Lesão C	Negativo	Negativo
20	187	2	5	Emagrecimento	SL	Negativo	Negativo
21	188	2	5	Diarreia	Lesão A	Positivo	Positivo
22	189	2	5	Diarreia e edema submandibular	Lesão C	Negativo	Positivo

Lesão A = inflamação multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides e células gigantes de Langhans. Lesão B = Inflamação multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides. Lesão C = infiltrado linfocitário multifocal leve na lâmina própria. SL = sem lesão.

Quadro 2. Comparação dos resultados das biópsias retais e análise dos tecidos do íleo e linfonodo mesentérico de búfalos

Ordem	Búfalo no.	Resultado da biópsia	Resultado da necropsia*	
			Íleo	Linfonodo mesentérico
1	52	Negativo	Negativo	Negativo
2	53	Negativo	Negativo	Negativo
3	118	Negativo	Negativo	Negativo
4	137	Negativo	Negativo	Negativo
5	138	Negativo	Negativo	Negativo
6	139	Positivo	Positivo	Negativo
7	177	Negativo	Negativo	Negativo
8	186	Negativo	Positivo	Positivo
9	187	Negativo	Negativo	Negativo
10	188	Positivo	Positivo	Positivo
11	189	Positivo	Positivo	Positivo

*Baseado no teste de ZN e de qPCR.

Quadro 3. Estatística Kappa obtida entre a biópsia retal e a análise de tecidos, segundo classificação dos resultados laboratoriais de búfalos

Biópsia retal	Análise de tecidos		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	7	1	8
Positivo	0	3	3
Total	7	4	11

Kappa = 0,792 IC95% [0,413; 1,0].

Figuras



Figura 1

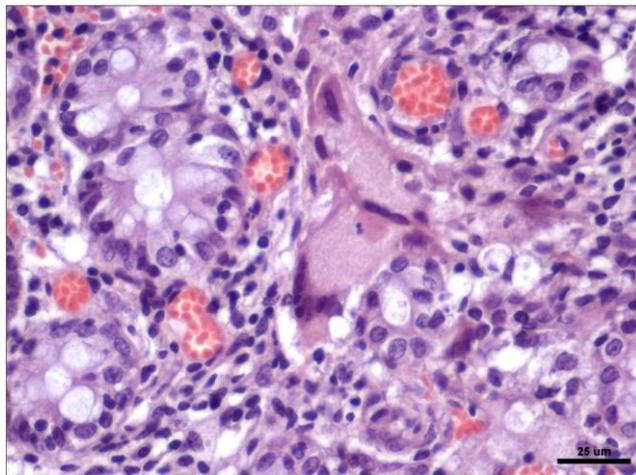


Figura 2

3. ARTIGO 2- TEORES DE COBRE, ZINCO E FERRO NO FÍGADO DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) COM PARATUBERCULOSE¹

Obs.: o artigo segue as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira e foi publicado neste periódico.

Alessandra dos S. Belo Reis², Marilene de Farias Brito³, Henrique A. Bomjardim², Kelson C.F. Faial⁴, Felipe M. Salvarani², Daniel G. Ubiali³, Carlos Magno C. Oliveira² e José D. Barbosa^{2*}

ABSTRACT.- Belo Reis A.S., Brito M.F., Bomjardim H.A., Faial K.C.F., Salvarani F.M., Ubiali D.G., Oliveira C.M.C. & Barbosa J.D. 2015. [**Copper, zinc and iron concentration in the liver of buffaloes (*Bubalus bubalis*) with paratuberculosis.**] Teores de cobre, zinco e ferro em búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(1):24-28. Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brasil. E-mail: diomedes@ufpa.com

In order to study copper, zinc and iron concentration in the liver of buffaloes with paratuberculosis (PTB), 13 buffalo cows above three years of age of the Murrah and Mediterranean races or their crosses were used. They originated from two farms in the municipalities of São Luís and São Mateus, state of Maranhão, Brazil. The animals were selected according to clinical signs of paratuberculosis, as diarrhea, dehydration and submandibular edema. Rectal biopsies for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) through qPCR and Ziehl-Neelsen stain were performed on all animals. Seven buffaloes revealed positive and six were negative for PTB. They were separated into two groups: Group 1 contained seven buffaloes positive for paratuberculosis, and Group 2 contained six animals negative for paratuberculosis. They were euthanized and postmortem examination was performed for the collection of various tissue samples to be fixed in 10% formalin for histopathology; also liver tissue samples were collected to be frozen for chemical analysis of trace minerals (Cu, Zn and Fe). Postmortem showed that all buffaloes with PTB had brown colored mesenteric lymphonodes, indicating hemosiderosis. One buffalo had brown spots on the mucosa of the small intestine. Histopathology revealed moderate to severe hemosiderosis of the spleen in buffaloes of Group 1. All animals positive for PTB

showed micromineral levels below the reference values. The average Cu concentration in buffaloes with PTB was only 18.0ppm and the one of Zn only 68.6ppm. In Group 2, negative for PTB, the average Cu concentration was 113.7ppm and the one of Zn 110.0ppm. Fe concentrations in buffaloes of both groups were high (>669ppm). The analysis of trace elements in the liver confirmed copper deficiency, but also showed low levels of zinc and high levels of iron. Based on clinical and pathological findings, and the micromineral concentrations found in the liver, it is concluded that paratuberculosis could lead to mineral deficiency and worsen the clinical condition of the buffaloes.

INDEX TERMS: Trace elements, copper, zinc, iron, paratuberculosis, buffaloes, Brazil.

¹ Recebido em 26 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 25 de janeiro de 2016.

² Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Bairro Saudade, Castanhal, PA 68740-970, Brasil. *Autor para correspondência: diomedes@ufpa.com

³ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

⁴ Laboratório de Toxicologia “Edilson Brabo”, Seção de Meio Ambiente (SAMAM), Instituto Evandro Chagas, Rodovia BR-316 Km 7, Levilândia, Ananindeua, PA 67030-000, Brasil.

RESUMO.- Com o objetivo de realizar um estudo dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) em búfalas com paratuberculose (PTB) foram utilizadas 13 búfalas, das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços acima de três anos de idade, pertencentes a duas propriedades localizadas nos municípios de São Luiz e São Mateus, no Estado do Maranhão. Os animais foram selecionados de acordo com a presença de sinais clínicos sugestivos de paratuberculose, caracterizado por estado nutricional regular a ruim, diarreia crônica líquida a semi-líquida, desidratação, edema submandibular e anestro prolongado. Foi realizada biópsia retal em todos os animais, para detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (*Map*) por meio da qPCR e exames histopatológicos (HE e Ziehl-Neelsen). No Grupo 1 sete animais foram positivos para presença de *Map*, e no Grupo 2 seis foram negativos. Todos os búfalos foram eutanasiados e necropsiados para coleta de diversos tecidos, parte fixados em formol a 10% para a realização da histopatologia e fragmentos de tecido hepático congelados para as dosagens dos microminerais (Cu, Zn e Fe). Na necropsia foi evidenciado que todos os animais positivos para PTB apresentavam linfonodos mesentéricos de coloração castanha sugestiva de hemossiderose. Adicionalmente, em um animal foram observados pequenos pontos de cor marrom distribuídos difusamente na mucosa do intestino delgado. Na

histopatologia foi observada hemossiderose moderada a acentuada no baço dos animais do Grupo 1. Na dosagem dos microminerais todos os animais com PTB apresentaram níveis abaixo dos valores de referência para Cu e Zn. Observou-se que a média dos teores de Cu dos búfalos com PTB foi 18,0ppm e de Zn 68,6ppm. No Grupo 2, a média dos teores de Cu foi 113,7ppm e de Zn 110,0ppm. Os teores de Fe em ambos os grupos foram elevados (>669ppm). Baseado nos achados clínico-patológicos e nas dosagens de minerais realizadas neste estudo, conclui-se que na região estudada, a PTB agravou o quadro clínico de animais com deficiência de Cu e Zn e, sugere-se que a doença seja capaz de induzir quadros de deficiência mineral marginal secundária.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Microelementos, cobre, zinco, ferro, paratuberculose, bubalinos, Brasil.

INTRODUÇÃO

Paratuberculose ou doença de Johne é causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) que acomete mamíferos, principalmente ruminantes domésticos e selvagens. A enfermidade é caracterizada por uma enterite granulomatosa, infecciosa e crônica, e a infecção se dá pela ingestão de colostro, leite ou água contaminados com fezes (Chiodini et al. 1984, Mota et al. 2010).

Em casos de paratuberculose (PTB) ocorre diarreia em função da enterite granulomatosa e má absorção de nutrientes (Chiodini et al. 1984), o que justifica a perda progressiva de peso e o mau estado corporal dos animais afetados, que podem gerar perdas econômicas importantes, em função da redução da conversão alimentar, diminuição da produtividade, redução dos níveis de proteína e gordura no leite, perda de peso ao abate, alta incidência de mastite e diminuição da fertilidade (Clarke 1997, Yamasaki et al. 2010).

Os minerais são nutrientes importantes que participam de várias vias metabólicas e exercem funções importantes na reprodução, manutenção do crescimento, metabolismo energético, resposta imune, entre outras atividades metabólicas necessárias ao desempenho produtivo dos animais (Wilde 2006, Lamb et al. 2008).

Paolicchi et al. (2013) realizaram estudo com amostras de soro bovino e observaram existir uma relação entre a deficiência de selênio com a infecção por *Map*. Os mesmos autores também constataram que um aumento no solo de 10ppm de ferro pode estar associado com o aumento no número de animais soropositivos para PTB. Lungton (2004) fez um paralelo entre a PTB e as deficiências de macro e microminerais, e inferiram que quadros graves da doença

estão relacionados com as deficiências minerais, atentando para a necessidade de mais estudos dentro dessa linha de pesquisa. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo dos teores de cobre, zinco e ferro em búfalos positivos para PTB no estado do Maranhão.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em duas propriedades de criação de bubalinos localizadas nos Municípios de São Mateus e São Luís, região nordeste do Estado do Maranhão, onde já existiam casos de paratuberculose (Belo-Reis et al. 2015). Os históricos foram coletados, junto aos proprietários, durante as visitas.

Animais e coleta das amostras. Foram utilizadas 13 búfalas das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços, com idades acima de três anos, criadas em sistema extensivo e em pastagens nativas e de *Brachiaria* spp. (Sinonímia *Urochloa*). A suplementação do rebanho era realizada através de um suplemento protéico-energético comercial (durante o período seco do ano) contendo proteína bruta (350g/kg), NNP (297g/kg), cálcio (60-68g/kg), fósforo (18g/kg), enxofre (8000mg/kg), sódio (47g/kg), cobalto (2,30mg/kg), cobre (200mg/kg), ferro (150mg/kg), iodo (10mg/kg), manganês (400mg/kg), selênio (2,0mg/kg), zinco (1000mg/kg), vit. A (40.000UI/kg) e flúor (180mg/kg). Onze animais pertenciam à fazenda localizada no município de São Mateus, e dois a fazenda situada no município de São Luís.

Os animais do estudo foram selecionados de acordo com a presença de sinais clínicos sugestivos de PTB. Em todos os animais foi realizada biópsia retal de acordo com metodologia descrita por Belo-Reis et al. (2015), para pesquisa de *Map* através de PCR em tempo real (qPCR) e Ziehl-Neelsen (ZN). Sete animais foram positivos para presença de *Map* e alocados no Grupo 1, e os outros seis foram negativos e alocados no Grupo 2. Devido ao prognóstico ruim, todos os animais foram eutanasiados e necropsiados, conforme recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA 2008). Durante as necropsias foram coletados fragmentos de diversos órgãos que foram fixados em formol a 10% tamponado e processados pelos métodos usuais para exame histológico. Amostras de cerca de 200g do lobo caudal de fígado foram coletadas com uma faca de aço inoxidável e armazenadas em sacos plásticos, identificadas e congeladas a -20°C até a realização das análises. Através do tecido hepático foram determinados os teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe).

Dosagem de minerais. As amostras de fígado foram seccionadas em fatias finas utilizando-se navalhas limpas e de aço inoxidável, armazenadas em tubos de polipropileno de

50mL e submetidas ao processo de liofilização. Para esse processo, as amostras, congeladas a -20°C, foram acondicionadas em bandejas e colocadas em aparelho automatizado LIOTOP® (modelo L101), previamente ligado por um período de 10 minutos a uma temperatura de -55°C, as quais permaneceram por um período de 24h para a secagem completa. Posteriormente, as amostras foram trituradas em grau e pistilo (Pinheiro et al. 2011).

Para a determinação dos minerais Cu, Zn e Fe, as amostras trituradas foram pesadas entre 0,250 a 0,260g e colocadas em tubo de digestão de Teflon (modelo Xpress). Em seguida, foram adicionados 3mL de ácido nítrico PA 65% (QUIMEX), 1mL de ácido clorídrico a 30% (MERCK) e 1mL de peróxido de hidrogênio PA 30% (BIOTEC); ficaram em repouso durante 2h para uma pré-digestão e digeridas por 50 minutos em sistema fechado por radiação de micro-ondas (MARSXpress, CEM Corp. Matthews, NC, USA). Após a digestão, os minerais Cu, Zn e Fe foram analisados pela técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP-OES) no equipamento ICP-OES (Vista-MPX CCD simultâneo, axial da VARIAN) em sistema de amostragem automático (SPS-5). O controle das condições operacionais do ICP-OES foi realizado com o software iTEVA. Os brancos analíticos foram preparados pelos mesmos procedimentos sem a adição das amostras de fígado (Nomura et al. 2005). As análises foram realizadas no Instituto Evandro Chagas (ICE).

RESULTADOS

Na fazenda localizada no município de São Mateus, MA, verificou-se que aproximadamente 70% das pastagens eram em terra firme composta por *Brachiaria* spp. (sinonímia *Urochloa*), e 30% em região de várzea composta por pastagens nativas. No ambiente de terra firme as fontes de água eram bebedouros e na região de várzea, os animais bebiam nos lagos formados durante o período de chuva. A suplementação protéico-energética era ofertada em cochos descobertos e a oferta não era continua ao longo do ano; no período de maior estiagem era ofertado somente sal proteinado. Na fazenda no município de São Luís as pastagens eram em terra firme compostas por *Brachiaria* spp. (Sinonímia *Urochloa*). A suplementação protéico-energética era realizada de forma semelhante à descrita anteriormente.

O quadro clínico apresentado pelos búfalos nas duas localidades caracterizava-se por estado nutricional regular a ruim (Fig.1.A-B), diarreia líquida a semi-líquida, desidratação, edema submandibular (Fig.1.A-B) e anestro prolongado. Os animais permaneciam longos períodos dentro dos lagos e quando eram estimulados a se locomover faziam de forma lenta.

Os sete animais positivos para detecção de *Map* (Búfalos 1-7, Grupo 1) apresentaram achados macroscópicos compatíveis com PTB, tais como aumento de linfonodos mesentéricos, mucosa do intestino delgado e grosso espessada, irregular, de aspecto reticulado e com dobras transversais evidentes. Observaram-se, ainda áreas espessadas em torno da válvula íleocecal, vasos linfáticos evidentes e áreas esbranquiçadas na superfície de corte dos linfonodos mesentéricos (Fig.2). Foi evidenciado também que esses animais tinham linfonodos mesentéricos com áreas de coloração acastanhada sugestiva de hemossiderose (Fig.2). Adicionalmente, no Búfalo 3, foram observados pequenos pontos difusos de cor marrom na mucosa do intestino delgado (Fig. 3), também sugestivos de hemossiderose. No Grupo 2 apenas três animais (Búfalos 8, 9 e 10) apresentaram linfonodos mesentéricos de coloração escura.

Nos sete búfalos com PTB, os exames histopatológicos revelaram infiltrado inflamatório granulomatoso rico em células gigantes na mucosa e infiltrado mononuclear na submucosa do intestino delgado. Nos linfonodos mesentéricos foram observadas células epitelioides e células gigantes na região cortical e medular. Os fragmentos de intestino e linfonodos mesentéricos apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAARs) pela coloração de ZN. Adicionalmente foram observados, hemossiderose moderada a acentuada no baço.

Os valores individuais, médias e desvio padrão dos teores de Cu e Zn no fígado dos búfalos avaliados com e sem paratuberculose estão apresentados no Quadro 1.

Os teores dos microminerais Cu e Zn no fígado dos búfalos com paratuberculose apresentaram-se abaixo do normal; já os teores de Fe em todos os búfalos foram superiores aos valores de referência. Quando se analisa as médias verifica-se que os teores de cobre estão extremamente baixos e os teores de zinco moderadamente. Já a média dos teores de Fe foi mais de duas vezes superior aos teores normais (Quadro1).

Nos animais sem paratuberculose (Búfalos 8-13), 50% (3/6) apresentam teores de Cu considerados como subdeficientes e quando se analisa a média obtida pelos seis búfalos verifica-se que os teores encontram-se acima de 100ppm, considerados no limite de normalidade. Achado semelhante foi obtido com o Zn onde também 50% (3/6) apresentaram teores abaixo de 100ppm, considerados também como subdeficientes. Quando se considera a média dos teores de Zn dos seis animais, esta ficou acima de 100ppm, também considerada no limite de normalidade (Quadro1).

DISCUSSÃO

Como demonstrado no presente estudo não podemos basear o diagnóstico da PTB apenas nos sinais clínicos, uma vez que, o emagrecimento progressivo acompanhado de diarreia pode estar presente em outras enfermidades como nas parasitoses, nas deficiências nutricionais e em outras doenças infecciosas virais e bacterianas (Yamasaki et al. 2010, 2013). Apesar de 53,8% (7/13) dos animais serem positivos para PTB, existe a necessidade da realização de exames complementares como histopatologia e qPCR, para a confirmação precisa do diagnóstico e, para a obtenção de dados epidemiológicos precisos sobre o *status* da enfermidade em um rebanho ou em uma região. Sweeney (1996) estimou que para cada caso clínico confirmado de PTB existam 15 a 25 animais sub clínicos. Baseado nesta estimativa pressupõe-se que as propriedades estudadas apresentam uma situação crítica quanto ao número de animais contaminados no rebanho.

A necropsia associada ao estudo histopatológico foi importante para o esclarecimento das causas do quadro clínico apresentado pelos bubalinos. Nos animais com PTB além das lesões típicas da enfermidade evidenciaram-se concomitantemente, lesões compatíveis com a deficiência de Cu que posteriormente foi confirmada por meio da histopatologia e da dosagem do elemento no fígado. Nos animais negativos os achados de necropsia foram compatíveis com deficiência de energia e proteína.

A média dos teores de Cu no fígado das búfalas com PTB foi de 18,0ppm e para os animais negativos foi de 113,7ppm. Segundo Underwood (1977) valores de Cu em fígado entre zero e 50ppm da matéria seca indicam deficiência, de 50 a 100ppm, subdeficiência, e níveis acima de 100ppm são adequados. Baseando-se nesses dados entende-se que nos búfalos do presente estudo a PTB agravou o quadro de deficiência deste mineral. Como os animais negativos do Grupo 2 eram criados juntos com os animais positivos do Grupo 1, e não apresentaram deficiência ou apresentaram subdeficiência deste elemento, isso demonstra que a PTB pode reduzir os níveis de Cu, e levar quadros de subdeficiência ao de deficiência. Como a absorção do Cu ocorre no intestino (Carvalho et al. 2003) a enterite granulomatosa presente na PTB contribui para a redução da absorção deste mineral.

A média dos teores de Zn nos animais do Grupo 1 foi 68,6ppm e no Grupo 2 de 110,0ppm. Segundo Underwood (1977), valores de Zn no fígado menores que 100ppm indicam deficiência e valores acima de 101ppm são considerados normais. Neste estudo ficou demonstrado que os animais com PTB apresentaram níveis de Zn abaixo dos considerados normais. Nos búfalos com PTB não foram observadas manifestações clínicas da deficiência de Zn, possivelmente por se tratar de uma deficiência de zinco marginal. Tokarnia et al. (2010) estudaram a deficiência de Zn e concluíram que provavelmente em algumas regiões,

as quantidades de Zn, mesmo que baixas, ainda seriam suficientes para satisfazer as exigências dos animais.

Conforme Underwood & Suttle (1999) as deficiências de Cu e Zn tem influência direta na resposta imune dos animais que apresentam deficiências destes microminerais, e como a concentração de Cu e Zn foram baixas nos animais do Grupo 1, possivelmente a resposta imunológica destes animais poderia estar comprometida e conseqüentemente, esse poderia ser mais um fator que leva ao agravamento do quadro clínico da PTB e também predispõe estes animais a uma maior susceptibilidade a outras infecções.

A média dos teores de Fe nos búfalos com PTB foi de 843,2ppm e nos búfalos negativos 669,9ppm. Segundo Underwood (1977) teores de Fe entre 181-380ppm são considerados normais e valores acima de 381ppm aumentados. No presente estudo os teores de Fe estavam aumentados tanto nos animais do Grupo 1 quanto nos do Grupo 2, sendo que nos búfalos com PTB, esses valores foram aproximadamente 20% maiores quando comparados aos do Grupo 2 (Búfalos negativos). É importante salientar que o excesso de ferro nos tecidos, principalmente no fígado, pode significar apenas hemossiderose, que ocorre na deficiência de Cu, e que foi observada nos búfalos do Grupo 1 deste estudo. Porém, como os teores de Fe estavam aumentados tanto nos animais deficientes como nos subdeficientes em Cu, infere-se que esses altos teores de Fe sejam oriundos da forragem e da mistura mineral ofertada aos animais.

De acordo com Underwood & Suttle (1999) o Fe é considerado um antagonista do Cu interferindo na sua absorção. Lounis et al. (2001) afirmam que uma dieta rica em Fe pode aumentar o número de *Map* e assim agravar o quadro clínico de PTB nos animais. Desta forma o excesso de Fe nos animais positivos poderia estar causando pelo menos dois efeitos deletérios, o primeiro associado à antagonização da absorção do Cu e segundo, poderia estar servindo como substrato para o crescimento e multiplicação de *Map* e favorecendo o agravamento do quadro clínico de PTB nos búfalos.

Com relação ao quadro de emagrecimento observado nos animais negativos do Grupo 2, este pode ser justificado pela baixa oferta de alimentos no período de estiagem, quando foram realizadas as visitas técnicas às propriedades. Outro fator que poderia contribuir seria os baixos teores de alguns minerais, causando uma deficiência subclínica, como foi observado em alguns búfalos negativos neste estudo (Búfalos 8, 11 e 12). De acordo com Tokarnia et al. (2010) esse tipo de deficiência é a que causa os maiores prejuízos, uma vez que, passa despercebida pelos profissionais e proprietários.

CONCLUSÃO

Baseado nos achados clínico-patológicos e nas dosagens de minerais realizadas no fígado dos búfalos deste estudo, conclui-se que a paratuberculose pode induzir quadros de deficiência mineral ou agravar quadros de subdeficiência, com conseqüente piora do quadro clínico da doença nos animais.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e ao Instituto Evandro Chagas pelo apoio a realização das dosagens dos minerais.

REFERÊNCIAS

- Belo Reis A.S., Brito M.F., Bezerra Jr P.S., Fonseca Jr A.A., Ubiali D.G., Mota R.A., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. *Pesq. Vet. Bras.* 35(10):823-828.
- Carvalho F.A.N., Barbosa F.A. & McDovel L.R. 2003. *Nutrição de Bovinos a Pasto*. Papelform, Belo Horizonte. 438p.
- Chiodini R.J. & Van Kruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218-262.
- Clarke C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116:217-261.
- CONCEA 2008. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, V do Art. 5º da Lei no.11.794, de 8 de outubro de 2008.
- Lamb G.C., Brown D.R., Larson J.E., Dahlen C.R., Dilorenzo N., Arthington J.D. & Dicostanzo A. 2008. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated Angus heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 106(3/4):221-231.
- Lounis N., Truffot-Pernot C., Grosset J., Gordeuk V.R. & Boelaert J.R. 2001. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Clin. Virol.* 20:123-126.
- Lungton I.W. 2004. Review of possible links between the clinical expression of paratuberculosis and deficiency of macro and micronutrients. *Aust. Vet J.* 82(8):490-496.
- Mota R.A., Peixoto P.V., Yamasaki E.M., Medeiros E.S., Costa M.M., Peixoto R.M. & Brito M.F. 2010. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):237-242.

- Nomura C.S., Silva C.S., Nogueira A.R.A. & Oliveira P.V. 2005. Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta B*. 60:673-680.
- Pinheiro C.P., Bomjardim H.A., Andrade S.J.T., Faial K.C.F., Oliveira C.M.C. & Barbosa J.D. 2011. Níveis de fósforo, cobre, cobalto e zinco em bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):193-198.
- Paolicchi F., Perea J., Cseh S. & Morsella C. 2013. Relationship between paratuberculosis and the microelements copper, zinc, iron, selenium and molybdenum in beef cattle. *Braz. J. Microbiol.* 44(1):153-160.
- Sweeney R.W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 12(12):305-312.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Barbosa J.D., Brito M.F. & Döbereiner J. 2010. Deficiências Minerais em Animais de Produção. Helianthus, Rio de Janeiro, 191p.
- Underwood E.J. 1977. Trace Elements in Human and Animals Nutrition. 4th ed. Academic Press, New York. 545p.
- Underwood E.J. & Suttle N.F. 1999. The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd ed. CABI Publishing, Wallingford. 614p.
- Wilde D. 2006. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96:240-249.
- Yamasaki E.M., Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):127-140.
- Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-932.

Legendas das Figuras

Fig.1. (A) Búfalo 3, positivo para paratuberculose, com escore corporal 2 e diarreia. (B) Búfalo 13, negativo para paratuberculose, com escore 2 e edema submandibular.

Fig.2. Linfonodo mesentérico de cor marrom com áreas esbranquiçadas na superfície de corte do Búfalo 3.

Fig.3. Pequenos pontos marrons distribuídos difusamente na mucosa intestinal do Búfalo 3, sugestivo de hemossiderose.

Quadro 1. Representação dos valores, médias e desvio padrão dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) nos búfalos positivos e negativos para paratuberculose

Búfalos com paratuberculose				Búfalos negativos			
Ident. Búfalo	Cobre (ppm)	Zinco (ppm)	Ferro (ppm)	Ident. Búfalo	Cobre (ppm)	Zinco (ppm)	Ferro (ppm)
Búfalo 1	69,1	69,3	593,1	Búfalo 8	88,7	197,3	795,5
Búfalo 2	17,6	64,4	803,5	Búfalo 9	136,6	113,0	1162,9
Búfalo 3	11,7	74,1	1285,4	Búfalo 10	125,4	68,1	478,6
Búfalo 4	11,6	43,4	689,6	Búfalo 11	56,4	65,8	316,2
Búfalo 5	8,0	54,7	686,8	Búfalo 12	95,1	140,8	484,3
Búfalo 6	5,5	80,6	800,6	Búfalo 13	179,9	75,0	781,8
Búfalo 7	3,0	93,9	1043,3				
Média e DP ^a	18,0±23,0	68,6±16,7	843±241,4	Média e DP ^a	113,7±43,1	110,0±52,0	669,9±305,8
Valores de referência ^b	<100	<100	181-380	Valores de referência ^b	<100	<100	181-380

^a Desvio Padrão, ^bUnderwood(1977).

Figuras



Figura 1



Figura 2



Figura 3

4. ARTIGO 3- SHORT COMMUNICATION: INFECÇÃO INTRAUTERINA POR *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* EM BÚFALO (*Bubalus bubalis*)

Obs.: o artigo segue as normas do Journal Veterinary Science & Medical Diagnosis e foi aceito para publicação, será publicado em língua inglesa.

Alessandra S. Belo-Reis ^a, Felipe M. Salvarani ^a, Marilene F. Brito ^b, Antônio A. Fonseca Jr. ^c, Natália S. Silva ^a, José A. S. Silveira ^a, Jenner K. P. Reis ^d, Jenevaldo B. da Silva ^e, Carlos M. C. Oliveira ^a & José D. Barbosa ^{a*}.

^a Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, CEP 68740-000 Castanhal, PA, Brazil. *Phone: +55 91 81469062. E-mail: diomedes@ufpa.br

^b Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

^c Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Pedro Leopoldo, MG 36000-000, Brasil.

^d Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil.

^e Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil.

Abstract

This study reports the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in the uterus and fetus of a buffalo (*Bubalus bubalis*). Samples of the buffalo cow's ileum, mesenteric lymph node, uterus and placenta as well as various fetal organs were collected. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), histopathology (hematoxylin-eosin (HE) staining) and Ziehl-Neelsen (ZN) staining were performed. Histopathological analysis revealed lesions consistent with paratuberculosis (PTB) in the mesenteric lymph node and small intestine, and ZN staining revealed the presence of acid-alcohol resistant bacilli (AARB). Histological lesions were not identified in fetal tissues. qPCR indicated that uterus, mesenteric lymph node and small intestine samples from the buffalo cow were positive for *Map*. In contrast, in the fetus, only samples from the digestive tract were positive for *Map* based on qPCR data. These results indicate that *Map* is present in various buffalo organs and tissues, including within the reproductive system. Therefore, the intrauterine transmission of *Map* may occur in buffaloes and could represent an important source of infection.

Keywords: Johne's disease; diagnostic; buffaloes; intrauterine transmission.

INTRODUÇÃO

A paratuberculose (PTB) é causada por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (*Map*), uma bactéria Gram-positiva em forma de pequenos bastonetes, aeróbica, não esporulada e de crescimento lento em meio de cultivo. A doença caracteriza-se clinicamente por um quadro crônico de diarreia intermitente, com emagrecimento progressivo, queda na produção e na fertilidade, bem como, pelo aumento da susceptibilidade a outras infecções. A PTB acomete primariamente mamíferos, sendo os ruminantes domésticos e selvagens os mais susceptíveis (15).

A principal via de transmissão descrita é a orofecal, na qual os animais se infectam ao ingerirem água e alimentos contaminados com fezes de animais infectados. O agente da PTB também é excretado no leite e colostro, constituindo importante via de propagação da enfermidade dentro de um rebanho (2). *Map* já foi detectado no útero, aparelho reprodutivo masculino e no sêmen, líquido alantoide e feto de bovinos (1, 6, 9, 10); e nos cotilédones e tecidos de fetos de ovelhas (7).

Em bubalinos adultos a doença foi diagnosticada na Índia (14), Paquistão (5, 11) e no Brasil (3, 8, 15), no entanto, ainda não foi relatada a presença de *Map* no tecido reprodutivo ou em fetos de búfalos, desta forma o objetivo deste trabalho é relatar a detecção de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (*Map*) em útero e feto de búfalo (*Bubalus bubalis*).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em uma propriedade localizada na BR 135, São Luís, MA, Brasil, em uma fêmea, da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*), de 10 anos de idade, com aproximadamente 90 dias de gestação, que apresentava emagrecimento progressivo, diarreia e acentuada debilidade física. Diante da suspeita clínica de PTB, associado ao prognóstico ruim do animal, a eutanásia foi a forma encontrada para se realizar a pesquisa para *Map* e de se

eliminar uma possível fonte de infecção dentro do rebanho. Na propriedade também já havia casos confirmados da doença. A eutanásia foi realizada conforme prescrição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2008).

À necropsia foram coletados fragmentos de íleo, linfonodo mesentérico, útero e placenta da búfala e fragmentos do cordão umbilical, fígado, rim e do sistema digestivo (*pool* de fragmentos do rúmen, abomaso e intestino delgado) do feto. Da búfala/mãe foram feitos esfregaços de fezes que foram corados pelo Ziehl-Neelsen (ZN) e os fragmentos de tecidos da mãe e do feto foram destinados ao estudo histopatológico, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo ZN. O material da mãe e do feto destinado à realização de PCR foi armazenado individualmente em tubos de polietileno capacidade 1,5 mL e congelados a -20°C para posterior processamento. A extração de DNA total dos fragmentos dos órgãos foi realizada por meio do Kit Qiagen (QIAamp[®] DNA Mini Kit para tecidos) segundo orientação do fabricante. As reações de qPCR para os genes *IS900* e *F57* foram realizadas segundo Irengé et al. (2009). Para o gene *IS900* foi utilizado os *primers* F-5'-TGCTGATCGCCTTGCTCA-3' e R-5'-GGGCCTGATCGGCGATGAT-3' e a sonda S-5'-FAM-CCG GGC AGC GGC TGC TTT ATA TTC-3'-BHQ1 (Sigma[®]); e para o gene *F57* os *primers* F-5'-TTCATCGATAACCCAAACTCAGAGA-30 e R-5'-GTTCGCCGCTTGAATGGT-3' e a sonda S-5'-Cy5-5'-TGCCAGCCGCCCCTCGTG-3'-BHQ) (Sigma[®]). Na reação foram utilizados 2 μL do DNA obtido, 12,5 μL do mix RealQ-PCR-RT dUTP-UNG Master Mix kit (Ampliqon, Dinamarca), *primers* na concentração de 0,6 pmol/ μL e sondas na concentração de 0,4 pmol/ μL , 0,5 μL de H_2O e 2 μL de MgCl_2 (50nM) (Invitrogen[®]), num volume total de reação de 25 μL . A reação foi iniciada a 50°C durante 2 minutos, e 95°C , durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C , por 15 segundos, anelamento/extensão a 60°C durante 1 minuto (4). Foi utilizado o mesmo protocolo para os dois genes. Cada amostra foi

testada em triplicata no termocilador LightCycler 480 (Roche, Alemanha) e a análise de dados realizada software de análise do mesmo fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal do estudo apresentava sinais clínicos caracterizados por emagrecimento progressivo (escore corporal 2 em uma escala de 1-5), edema submandibular, edemas cavitários (abdominal e torácico), diarreia crônica profusa e intermitente, eliminada muitas vezes sob forma de jatos (Fig. 1), achados também citados por Mota et al. (8), Yamasaki et al. (15) e Dalto et al. (3) em bubalinos diagnosticados com paratuberculose.

Os esfregaços de fezes corados pelo ZN evidenciaram a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Fig.2). O estudo histológico dos tecidos coletados da búfala revelou lesões compatíveis com paratuberculose em linfonodo mesentérico e em intestino delgado e nestes tecidos a presença de BAAR pela coloração de ZN. Achados também observados por Khan et al. (5), Mota et al. (8), Yamasaki et al. (15) e Dalto et al. (3) em búfalos com paratuberculose, que evidenciaram a presença de BAAR e/ou na PCR foram positivos. Não se identificou lesões histológicas nos tecidos do feto. Isso pode ser justificado pelo fato dos animais só desenvolverem a enfermidade quando adultos, não sendo possível a visualização de lesões em animais jovens (13).

Os tecidos do útero, linfonodo mesentérico e intestino delgado da búfala mostraram-se positivos na qPCR para *Map*. Já no feto apenas os tecidos do sistema digestivo mostraram-se ser qPCR-positivo. Nestes tecidos, tanto da búfala quanto do feto, observou-se amplificação do fragmento dos genes *IS900* e *F57* por qPCR. Uma das principais diferenças entre *Map* e outras bactérias do complexo *M. avium* é a presença de 14 a 18 cópias do elemento de inserção *IS900* no genoma de *Map*, sendo este o fragmento de DNA mais utilizado para técnicas de diagnóstico molecular. Adicionalmente, foi descrito a utilização do gene *F57* para detecção de *M. avium* (3, 8, 12).

No presente estudo, não foi realizada cultura bacteriana. A realização do diagnóstico de paratuberculose através de PCR utilizando IS900 têm demonstrado resultados satisfatórios e rápidos. Além disso, a região é recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (16). Ravva e Stanker (17) mostraram que esta região é específica para *Map*, sendo capaz de diferenciar a bactéria das demais do complexo *Mycobacterium avium*.

Silva & Pizelli (10) relataram a observação de BAAR em baço de feto de uma fêmea bovina com sinais clínicos da enfermidade no Brasil. Nos estudos realizados por Whittington & Windsor (13) em bovinos com paratuberculose, detectou-se a infecção intrauterina nesta espécie e os mesmos afirmam que esses animais desenvolvem a doença quando adultos, e ainda que esta forma de transmissão vertical é um ponto crítico na implantação de medidas de controle e profilaxia no rebanho. Seitz et al. (9) detectaram a presença de *Map* no útero e em fetos de bovinos de fêmeas positivas para paratuberculose por meio de cultura em meio Herrold. Buergelt et al. (1) também detectaram *Map* em líquido alantoide e em fetos de bovinos por meio de Nested-PCR. Lambeth et al. (7) detectou *Map* em cotilédone e tecidos de fetos de ovelhas através de cultura bacteriana.

A infecção intrauterina de bovinos em estágio avançado da doença pode ocorrer quando a fêmea gestante é portadora de grande quantidade de microrganismos e a anergia permite a migração de macrófagos infectados para outros órgãos através do sistema linfático (15).

Pesquisa em tecidos intestinais e linfonodos mesentéricos de búfalos com resultado positivo para paratuberculose já foi realizada por Sivakumar et al. (11), Khan et al. (5), Mota et al. (8) e Dalto et al. (3) por meio de ZN e PCR. Sivakumar et al. (11) realizaram adicionalmente cultura bacteriana e Dalto et al. (3) realizaram imunohistoquímica. No entanto, nenhum desses autores realizou pesquisa de *Map* em útero ou no feto, muito menos a possível transmissão via uterina.

CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a detecção de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (*Map*) em útero e feto de búfalo (*Bubalus bubalis*). Diante destes achados conclui-se que a presença de *Map* em bubalinos ocorre em diferentes órgãos e tecidos, inclusive no sistema reprodutivo e que a transmissão intrauterina é uma importante rota de infecção dentro da cadeia epidemiológica da PTB no sistema de produção de bubalinos.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas; e INCT-Pecuária pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. **Buergelt CD, Williams E, Monif GRG, Pinedo P & Decker JH.** Nested-polymerase chain reaction in prenatal detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) in bovine allantoic fluid and fetuses. *Int J Appl Res Vet M* 2006, **4**(3), 232-238.
2. **Clarke CJ.** 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 2013, **116**, 217-261.
3. **Dalto AC, Bandarra PM, Pavarini SP, Boabaid FM, Bitencourt APG, Gomes MP, Chies J, Driemeier D. & Cruz CEF.** Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Trop Anim Health Prod* 2012, **44**, 1-5.
4. **Irengue LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K & Gala JL.** Development and validation of a triplex real-time PCR-RT for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet Microbiol* 2009, **136**, 166-172.
5. **Khan FA, Chaudhry ZI, Ali MI, Khan S, Mumtaz N & Ahmad I.** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. *Trop Anim Health Prod* 2010, **42**, 633-638.

6. **Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W & Pavlik I.** Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *J Vet Med Sci* 2010, **72**(10), 1283-1288.
7. **Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H & Whittington RJ.** Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Australian Vet J* 2008, **82**(8), 504-508.
8. **Mota RA, Peixoto PV, Yamasaki EM, Medeiros ES, Costa MM, Peixoto RM & Brito MF.** 2010. Occurrence of paratuberculosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Pernambuco. *Pesq Vet Bras* 2004, **30**, 237-242.
9. **Seitz SE, Heider LE, Heuston WD, Bech-Nielsen S, Rings DM & Spangler L.** Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J American Vet Med Assoc* 1989, **194**, 1423-1426.
10. **Silva NM & Pizelli GN.** Estudos sobre a paratuberculose. I. Diagnóstico de um caso da doença. *Arq Inst Biol Animal, Rio de Janeiro* 1961, **4**, 169-173.
11. **Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N & Sharma AK.** Pathology of naturally occurrence paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet Pathol* 2006, **43**(4), 455-462.
12. **Timms VJ, Gehringer MM, Mitchell HM, Daskalopoulos G & Neilan BA.** Review. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *J Microbiol Meth* 2011, **85**, 1-8.
13. **Whittington RJ & Windsor PA.** In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet J* 2007, **179**(1), 60-69.
14. **Yadav D, Singh SV, Singh AV, Sevilla I, Juste RA, Singh PK & Sohal JS.** Pathogenic 'Bison-type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. *Comp Immunol Microb J* 2008, **31**, 373-387.
15. **Yamasaki EM, Brito MF, Mota RA, McIntosh D & Tokarnia CH.** Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq Vet Bras* 2013, **33**(2), 127-140.
16. **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL – OIE.** Paratuberculosis: Johne's disease. 2007. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/paratuberculosis.pdf>>. Acesso em: 8 set. 2014.

17. **Ravva, S. V.; Stanker, L. H.** Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *J Microbiol Method* 2005, 63(3), 305-317.

Legenda das figuras

Fig. 1- Paratuberculosis in a buffalo. **A.** Buffalo cow with a body condition score of 2 and submandibular edema. **B.** Presence of acid-alcohol resistant bacilli in a buffalo cow stool smear subjected to Ziehl-Neelsen staining.

Figuras

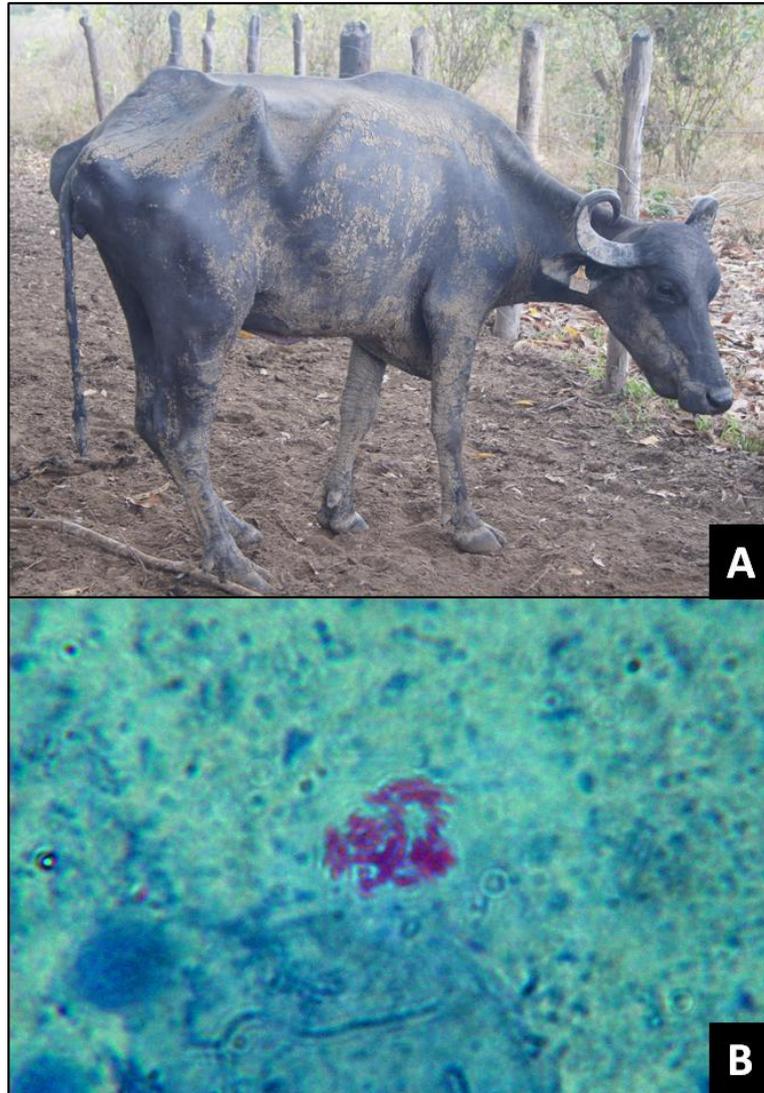


Fig. 1 - A e B.

6. CONCLUSÃO GERAL

A análise da biópsia retal pode ser empregada para auxiliar no diagnóstico *ante mortem* em búfalos de rebanhos com suspeita de paratuberculose; pela mesma foi possível detectar animais positivos através da coloração de ZN e qPCR. Os resultados obtidos podem ser utilizados no controle da enfermidade para selecionar e eliminar animais positivos do rebanho, diminuindo gradualmente, a disseminação do agente no ambiente, e a consequente contaminação de outros animais

Baseado nos achados clínico-patológicos e nas dosagens de minerais realizadas no fígado dos búfalos deste estudo, conclui-se que a paratuberculose pode induzir quadros de deficiência mineral ou agravar quadros de subdeficiência, com consequente piora do quadro clínico da doença nos animais.

A presença de *Map* em bubalinos ocorre em diferentes órgãos e tecidos, inclusive no sistema reprodutivo e a transmissão intrauterina pode ser uma importante rota de infecção dentro da cadeia epidemiológica da PTB no sistema de produção de bubalinos.