

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE PARATUBERCULOSE EM BUFALOS
(*Bubalus bubalis*) NO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL

André Gustavo Cabrera Dalto

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE PARATUBERCULOSE EM BUFALOS
(*Bubalus bubalis*) NO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL

Autor: André Gustavo Cabrera Dalto

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: David Driemeier

Porto Alegre

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Dalto, André Gustavo Cabrera
Achados clínicos e patológicos de paratuberculose
em búfalos (BUBALUS BUBALIS) no Rio Grande do Sul -
Brasil / André Gustavo Cabrera Dalto. -- 2011.
60 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Paratuberculose. 2. MYCOBACTERIUM AVIUM
subespécie PARATUBERCULOSIS. 3. Doença de John. 4.
Búfalo. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

André Gustavo Cabrera Dalto

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE PARATUBERCULOSE EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2011.

APROVADO POR:

Prof. Dr David Driemeier (UFRGS).
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava (UDESC).
Membro da Comissão

Prof. Dr. Ana Lúcia Schild (UFPEL).
Membro da Comissão

Prof. Dra. Cláudio Barros (UFSM).
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer meus pais Gustavo e Martha pelo apoio incondicional que recebi no decorrer de minha vida, ressalto que somente com a ajuda de vocês estou podendo realizar meu objetivo. Do fundo do meu coração, muito obrigado por tudo. Amo muito vocês.

Agradeço ao Federico que além de irmão é com certeza meu melhor amigo e junto com minha cunhada Joyce sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço minha família inteira, não gostaria de citar nomes, pois seria uma injustiça esquecer de alguém, porém tenho que salientar a importância de minhas avós Farideh e Rodis, “las amo, abuelas”!

Agradeço a minha namorada Paula, com quem convivo desde o início da faculdade.

Agradeço ao professor David Driemeier que me proporcionou a oportunidade de estagiar no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS por três anos durante a faculdade e por ter me orientado no mestrado.

Agradeço ao professor Cláudio Estevão Farias da Cruz que sempre me deu apoio.

Agradeço também a todas as pessoas que fazem ou fizeram parte do Setor de Patologia da UFRGS ao longo destes últimos cinco anos. Muito obrigado pelo companheirismo!

Muito obrigado Angélica, Bárbara, Cláudio, Danilo Eduardo, Fabiana, Paulo, Saulo e Tatiana pela enorme ajuda na realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Não é a espécie mais forte que sobrevive, nem a mais inteligente, mas sim a mais adaptável à mudança”.

Charles Darwin

“Vamos suerte, vamos juntos, dende que juntos nacimos; y ya que juntos vivimos sin podernos dividir... Yo abriré con mi cuchillo el camino pa seguir”

Martín Fierro

RESUMO

Descrevem-se os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos da paratuberculose em um rebanho de búfalos no Município de Guaíba no Rio Grande do Sul. A propriedade possuía cento e noventa e quatro búfalos principalmente da raça mediterrâneo e destinava-se a produção de leite e carne. No período de abril de 2009 a setembro de 2010 seis búfalos apresentaram diarreia crônica intermitente, perda de peso e apetite normal. Na necropsia observaram-se vasos linfáticos proeminentes no mesentério e na mucosa do intestino. Os linfonodos mesentéricos estavam moderadamente aumentados, com áreas escuras entremeadas com focos multinodulares brancacentos, principalmente na região cortical. A mucosa do intestino se encontrava espessa e cerebriforme. Ao exame histológico, desde o duodeno até o intestino grosso havia infiltrado composto principalmente por macrófagos epitelióides e, em menor escala, linfócitos, plasmócitos e células gigantes tipo Langhans. Outros achados observados foram dilatação dos vasos linfáticos, linfangite granulomatosa e linfangiectasia. Nos linfonodos mesentéricos verificaram-se lesões histológicas semelhantes. A coloração de Ziehl-Neelsen e a imuno-histoquímica revelaram bacilos álcool-ácido resistentes no interior de macrófagos, de células gigantes de Langhans e livres na mucosa e submucosa do intestino e dos linfonodos mesentéricos. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* foi isolado em cultivo bacteriano de amostras de fezes, raspado de mucosa intestinal e de linfonodos mesentéricos. A identificação do agente foi realizada pela técnica de PCR IS900. Foi realizado, também, levantamento sorológico de 136 búfalos da propriedade através da técnica de ELISA, na qual foram observados 15,45 % reagentes. O diagnóstico da paratuberculose foi baseado nos dados clinicopatológicos, sorologia, isolamento e identificação do agente.

Palavras Chave: Paratuberculose, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, *Bubalus bubalis*, Búfalo

ABSTRACT

It's described the epidemiologic, clinical and pathologic aspects of paratuberculosis in a bubaline herd in Guaiba city, southern Brazil. The property had one hundred and ninety animals for milk and meat production. Six adults Mediterranean breed bubalines showed chronic intermittent diarrhea, lost of weight and normal appetite. At necropsy, the lymphatic vessels were prominent in the serosa, the mesenteric lymphnodes were slightly enlarged with dark areas interwoven by multinodular white spots mainly in the cortical region. The intestine mucosa were thickened and of corrugated aspect. The microscopic exam revealed severe diffuse granulomatous inflammation, marked dilatation of the lymphatic vessels, granulomatous lymphangitis and lymphangioectasia from the duodenum to the large bowl. The mesenteric lymphnodes showed similar histological lesions. Acid-fast bacilli in macrophages, in Langhans giant cells and freely in the mucosa and submucosa of the small intestine and lymphnodes were shown at Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* was isolated through bacterial cultivation of samples taken from feces, intestinal mucosa, mesenteric lymphnodes, and identified through IS900 PCR. In addition, a serologic survey was performed in the property by ELISA test. 15.45 percent of the animals reacted positive to the test. The diagnosis of paratuberculosis was based on clinical, pathological and epidemiological data, serology exam, bacterial isolation and identification of the agent.

Key words: paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, *Bubalus bubalis*, bubaline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa do Brasil, demonstrando em verde os Estados com relatos de paratuberculose..... 16
- Figura 2** - Paratuberculose. Fêmea após ordenha receptiva à amamentação de diversos bezerros..... 30
- Figura 3** - Paratuberculose. Búfalo 1. Péssimo estado corporal, decúbito lateral permanente e evidência de diarreia esverdeada semi líquida. 31
- Figura 4** - Paratuberculose. Búfalo 3. Péssimo estado corporal, decúbito esternal permanente e evidência de diarreia esverdeada líquida. 31
- Figura 5** - Paratuberculose. Búfalo 4. Animal em decúbito lateral com opistótono e movimentos de pedalagem. 32
- Figura 6** - Paratuberculose. Búfalo 4. Jejuno. Vasos linfáticos evidentes, tortuosos e levemente esbranquiçados..... 33
- Figura 7** - Paratuberculose. Búfalo 2. Linfonodo mesentérico com região medular amarronzada e focos multinodulares brancos em região cortical. Vasos linfáticos evidentes sob a serosa do jejuno..... 33
- Figura 8** - Paratuberculose. Búfalo 6. Jejuno. Mucosa espessada com aspecto cerebroide 34
- Figura 9** - Paratuberculose. Búfalo 6. Ceco. Mucosa espessada com aspecto cerebroide 34
- Figura 10** - Paratuberculose. Búfalo 5. Válvula ileocecal aumentada e edemaciada..... 35
- Figura 11** - Paratuberculose. Búfalo 4. Coração. Placas irregulares, esbranquiçadas de mineralização, opacas, rugosas e firmes no endocárdio do átrio esquerdo. 35
- Figura 12** - Paratuberculose. Búfalo 2. Jejuno. Atrofia e fusionalidade de vilosidades com intenso infiltrado de macrófagos epitelioides e ocasionais células gigantes na mucosa. Perilinfangite granulomatosa na submucosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 10..... 37
- Figura 13** - Paratuberculose. Búfalo 5. Válvula ileocecal. Intenso infiltrado de macrófagos epitelioides e ocasionais células gigantes na mucosa com atrofia de vilosidades. Hematoxilina e eosina. Obj. 10. 38
- Figura 14** - Paratuberculose. Búfalo 5. Ceco. Infiltrado moderado de macrófagos epitelioides e células gigantes tipo Langhans na mucosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 20 38
- Figura 15** - Paratuberculose. Búfalo 6. Válvula ileocecal. Intenso infiltrado de células gigantes tipo Langhans em tecido linfóide. Hematoxilina e eosina. Obj. 20..... 39

Figura 16 - Paratuberculose. Búfalo 5. Íleo. Linfangiectasia, perilinfangite e endolinfangite granulomatosa em vasos linfáticos da sub mucosa . Hematoxilina e eosina. Obj. 20.....	39
Figura 17 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Infiltrado difuso acentuado de macrófagos epitelioides e células gigantes tipo Langhans. Hematoxilina e eosina. Obj. 10. ..	40
Figura 18 - Paratuberculose. Búfalo 4. Linfonodo mesentérico. Perilinfangite mononuclear, linfangiectasia e endolinfangite granulomatosa em um vaso linfático da cápsula. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.	41
Figura 19 - Paratuberculose. Búfalo 4 Rúmen. Mineralização difusa na serosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 4.	41
Figura 20 - Paratuberculose. Búfalo 5. Cólon. Demonstração dos BAAR no interior de macrófagos epitelioides através da coloração de Ziehl-Neelsen. Obj.40.....	43
Figura 21 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Infiltrado de células gigantes com BAAR no seu interior. Coloração de Ziehl-Neelsen. Obj.40.	43
Figura 22 - Figura 3012. Paratuberculose. Búfalo 2. Jejuno. Imuno-histoquímica com anticorpo anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> demonstrando antígenos predominantemente na porção apical das vilosidades . Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 4.	44
Figura 23 - Paratuberculose. Búfalo 6 Cólon. Imuno-histoquímica com anticorpo anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> demonstrando a distribuição dos antígenos na mucosa e em tecido linfoide da submucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 4.	44
Figura 24 - Paratuberculose. Búfalo 6 Válvula ileocecal. Imuno-histoquímica com anticorpo anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> demonstrando antígeno no interior de macrófagos epitelioides e células gigantes na mucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 40.	45
Figura 25 - Paratuberculose. Búfalo 5. Ceco. Imuno-histoquímica com anticorpo anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> demonstrando antígenos na porção apical da mucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 20.	45
Figura 26 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Imuno-histoquímica com anticorpo anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> demonstrando antígenos no interior de células gigantes na região cortical. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 40.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de idade, raça, sexo e evolução do quadro clínico dos seis búfalos necropsiados da raça mediterrâneo com paratuberculose.....	29
Tabela 2 - Intensidade das lesões em diferentes segmentos intestinais dos búfalos 4, 5 e 6 acometidos pela paratuberculose.	36
Tabela 3 - Intensidade de coloração de BAAR pela técnica de Ziehl-Neelsen e marcação positiva na imuno-histoquímica (IHQ) em diferentes fragmentos intestinais e linfonodos mesentéricos dos búfalos 4, 5 e 6 acometidos por paratuberculose.	42
Tabela 4 - Resultados do teste de ELISA nos animais do rebanho.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGID - Imunodifusão em gel de agarose

BAAR - Bacilo Álcool ácido resistente

DAB – 3,3 Diaminobenzidine

DC - Doença de Crohn

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assays*

HE - Hematoxilina e eosina

LABACVET-UFRGS - Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Map - *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

PCR - Reação em cadeia de Polimerase

ptb – Paratuberculose

SPV-UFRGS - Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 - Histórico	14
2.2 - Paratuberculose no Brasil	15
2.3 - Etiologia	17
2.4 - Epidemiologia	18
2.4.1 - Morbidade e Mortalidade	18
2.4.2 - Transmissão	18
2.5 - Patogenia	19
2.6 - Sinais clínicos	20
2.7 - Achados de necropsia	21
2.8 - Achados microscópicos	21
2.9 - Diagnóstico	22
2.10 - Diagnósticos diferenciais	23
2.11 - Tratamento	23
2.12 - Controle e prevenção	23
2.13 - Potencial zoonótico	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4. RESULTADOS	29
4.1 Necropsia	32
4.2 Histopatologia	36
4.3 Ziehl-Neelsen e Imuno-histoquímica	42
4.4 Isolamento Bacteriano	46
4.5 PCR	46
4.6 ELISA	46
5. DISCUSSÃO	47
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Map) (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; AGIRREGOMOSKORTA, 2007; NIELSEN; TOLF, 2009). Trata-se de uma enterite granulomatosa progressiva crônica que acomete mamíferos, principalmente ruminantes domésticos e selvagens (CHIODINI *et al.*, 1984; KREEGER, 1991; FERREIRA *et al.*, 2005). Após a infecção, que ocorre principalmente pela rota fecal-oral, o Map se multiplica no interior de macrófagos e desencadeia uma reação inflamatória com proliferação dessas células de defesa no intestino e nos linfonodos mesentéricos, causando lesões granulomatosas (CLARKE, 1997). Essa enterite determina má absorção de nutrientes e diarreia crônica acompanhada de perda de peso (POESTER; RAMOS, 1994; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Em ovinos e caprinos, a diarreia não é grave ou está ausente, mas permanecem os sinais clínicos associados à perda de peso e à diminuição de produção (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os animais podem apresentar também uma forma subclínica, na qual ocorre eliminação do agente no ambiente, constituindo-se uma fonte de risco ao rebanho ou animais próximos. A transmissão do Map ocorre principalmente pelas fezes de animais contaminados, mas pode ocorrer transmissão intrauterina e também via colostro (COCITO *et al.*, 1994; SWEENWY 1996). Animais que desenvolvem a doença clínica, em geral são aqueles infectados nas primeiras semanas de vida, porém os sinais clínicos somente se manifestam quando adultos (RADOSTITS *et al.*, 2007, SWEENWY 1996).

A enfermidade tem distribuição mundial e a doença clínica foi descrita pela primeira vez em 1895 por Johne e Frothingham na Alemanha (KREEGER, 1991; LILENBAUM; MARASSI; OELEMANN, 2007). No Brasil, foram diagnosticados casos esporádicos de paratuberculose em bovinos no Rio de Janeiro (SANTOS; SILVA, 1956; DACORSO FILHO *et al.*, 1960; YAMASAKI *et al.*, 2010), Mina Gerais (NAKAJIMA *et al.*, 1991), Santa Catarina (PORTUGAL *et al.*, 1979), Rio Grande do Sul (RAMOS *et al.*, 1986; DRIEMEIER *et al.*, 1999), Paraíba (DIAS *et al.*, 2002), Goiás (ACYPRESTE *et al.*, 2005) e Pernambuco (MOTA *et al.*, 2007). Em ovinos, a enfermidade foi descrita na Paraíba (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A paratuberculose em bubalinos é pouco descrita, tendo em vista que esses animais aparentemente apresentam certo grau de resistência à enfermidade, tendo sido relatada apenas uma vez no Brasil em Pernambuco (MOTA *et al.*, 2010). Map é incriminado, por alguns

autores, como agente envolvido em uma ileocolite granulomatosa que afeta humanos, denominada doença de Crohn (CHIODINI; ROSSITER, 1996).

Não existe tratamento eficaz autorizado para a paratuberculose e o diagnóstico no animal vivo pode ser realizado através de cultivo de fezes e leite (GOMES *et al.*, 2002). Outro exame que pode ser realizado para diagnóstico no animal vivo no animal vivo é a sorologia (COELHO *et al.*, 2010). Ambas as técnicas são utilizadas como medida de controle da enfermidade, estando recomendado o subsequente abate dos reagentes positivos (RADOSTITS *et al.*, 2007). Para a confirmação do diagnóstico deve ser realizada necropsia, baseando-se o diagnóstico nos achados macroscópicos e microscópicos (DACORSO FILHO *et al.*, 1960), podendo ser realizadas as provas de imuno-histoquímica (BREES *et al.*, 2000), coloração de Ziehl-Neelsen (COELHO *et al.*, 2008), PCR (WHITTINGTON *et al.*, 1998; SHIN *et al.*, 2004) e cultivo bacteriológico (GOMES *et al.*, 2002) para confirmação do diagnóstico. Esse trabalho teve por objetivo relatar casos de paratuberculose observados em búfalos de um estabelecimento do município de Guaíba no Rio Grande do Sul, e enfatiza as alterações clínico-patológicas e demonstração, isolamento e identificação de Map nas fezes e tecidos dos animais acometidos. Foi realizado também, um estudo sorológico para verificar a prevalência de animais reagentes na propriedade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Histórico

A paratuberculose (ptb) foi relatada pela primeira vez em 1895 por John e Frothingham, na Alemanha, como um caso de tuberculose atípica, em uma vaca de seis anos que apresentava perda de peso e diarreia crônica. Ao exame macroscópico, foram detectados espessamento e enrugamento da mucosa do intestino delgado. O material foi encaminhado ao Instituto de Patologia de Dresden, onde os patologistas H. A. John 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), verificaram-se grande quantidade de agrupamentos bacterias (KREEGER, 1991; GOMES, 2002; LILENBAUM; MARASSI; OELEMANN, 2007). Por volta de 1900, essa doença já estava distribuída em rebanhos do mundo todo. Bang propôs que o seu nome fosse Ptb, pois apesar de ser semelhante à tuberculose possuía entidade diferente. Ainda nessa década, Bang reconheceu que a tuberculina aviária poderia ser utilizada como reagente no diagnóstico da enfermidade estabelecendo associação do agente da Ptb com o *Mycobacterium avium* (CHIODINI, 1993b; GOMES, 2002). Em 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, que já havia proposto que a enfermidade se chamasse doença de John, denominou de jonina o produto equivalente à tuberculina e usada para o diagnóstico da Ptb. Em 1923, o agente foi chamado oficialmente de *Mycobacterium paratuberculosis* no Manual de Bergey. Nas décadas seguintes, os estudos sobre a doença foram intensificados e foi evidenciada sua distribuição mundial, afetando inclusive animais silvestres (CHIODINI, 1993b; 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 *et al.*, 1984; McFADDEN *et al.*, 1987; CHIODINI, 1989a; COCITO *et al.*, 1994).

2.2 - Paratuberculose no Brasil

O primeiro registro de Ptb no país foi feito pelo professor Octavio Dupont, em uma nota no Jornal do comércio de 5 de novembro de 1915. Ele relatou a presença da enfermidade em animais importados, da raça flamenga, no Posto Zootécnico Federal de Pinheiros, no Rio de Janeiro. O autor afirma que os resultados das investigações em andamento seriam publicados posteriormente, no entanto isso jamais ocorreu (SANTOS; SILVA, 1956; DACORSO FILHO *et al.*, 1960). Em relatos pessoais, Dupont afirma ter confirmado o diagnóstico clínico através de exames necroscópicos e bacteriológicos, nos quais o isolamento bacteriano foi realizado e publicado pelo professor Antônio Carini no jornal O Estado de São Paulo. Porém, Dupont acreditava, na época, que a Ptb fosse comum no Brasil, assim como na Europa, por isso não se preocupou em transformar sua nota em artigo científico (DACORSO FILHO *et al.*, 1960). Em 1956, ocorreu o primeiro relato detalhado da doença em um touro da raça holandes de seis anos de idade, no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro e que havia sido importado da Holanda com um ano e meio de idade (SANTOS; SILVA, 1956). Em 1960, a enfermidade foi descrita em dois bovinos nacionais, da raça Jersey, no município de Petrópolis, Rio de Janeiro e em um touro filho de vaca importada da Holanda, no município de Bangú. Esses três casos foram confirmados por histopatologia com verificação de BAAR na coloração de Ziehl-Neelsen (DACORSO FILHO *et al.*, 1960). Subsequentemente, casos de Ptb foram registrados em um bovino nativo no Rio de Janeiro (SILVA; PIZELI, 1961), dois bovinos em Santa Catarina: um nacional e outro importado da Holanda (PORTUGAL *et al.*, 1979). A doença foi diagnosticada, também, em um touro Holandês nascido no Rio Grande do Sul e mantido em uma central de inseminação (RAMOS *et al.*, 1986) e uma vaca nascida nos Estados Unidos, importada para o Paraná e transportada para Minas Gerais (NAKAJIMA *et al.*, 1991). Em 1994, a enfermidade foi reproduzida experimentalmente em caprinos no Brasil através da inoculação de fragmentos de intestino de um bovino afetado com Ptb (POESTER; RAMOS 1994).

Um surto de Ptb relatado no Rio Grande do Sul por Driemeier *et al.* (1999) incluiu lesões histopatológicas compatíveis com Ptb e crescimento de Map em cultivo bacteriológico de tecido de oito vacas holandesas importadas da Argentina, entre 3 e 5 anos de idade. 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 da raça Blond d'Aquitaine com quatro anos de idade, 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; MOTA *et al.*, 2009).

Oliveira *et al.* (2010) relataram pela primeira vez no Brasil, na Paraíba, casos naturais de Ptb em caprino e ovino, confirmando a enfermidade através de exames histopatológico e imuno-histoquímicos. Mota *et al.* (2010) descreveram o único relato de paratuberculose em búfalos no Brasil, em Pernambuco. Dois animais foram necropsiados e apresentavam as 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. Levantamentos sorológicos foram realizados em Mato Grosso do Sul (FERREIRA; FONSECA; LILENBAUM, 2001), Pará (SILVA, 2005) e Goiás (ACYPRESTE *et al.*, 2005), evidenciando a presença de bovinos reagentes para Ptb nessas regiões do país. Portanto, atualmente, o Brasil possui dez estados com relatos de Ptb como demonstrado na Figura 1.

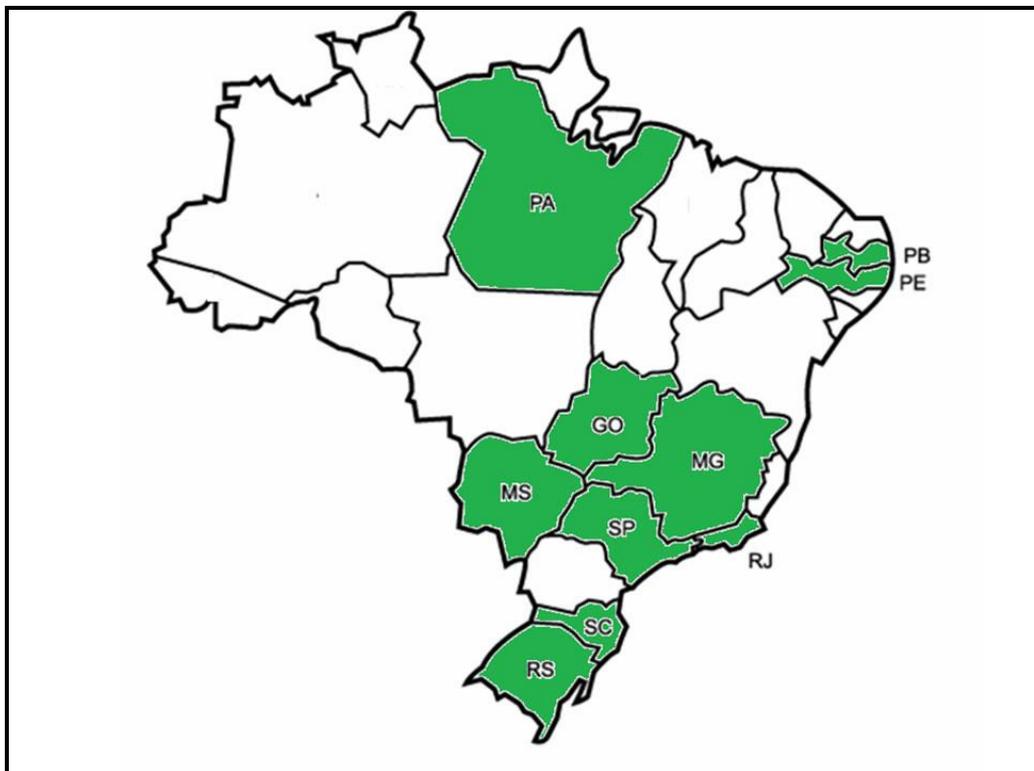


Figura 1 - Mapa do Brasil, demonstrando em verde os Estados com relatos de paratuberculose.

2.3 - Etiologia

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis*, Família *Mycobacteriaceae* é o agente etiológico da Ptb ou doença de Johne (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 lipídios (ácido micólico que forma uma camada cérea). Isso faz com que a bactéria seja resistente a condições, tais como ressecamento e drogas antibacterianas. 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 lentamente por essa camada, contribuindo para o crescimento lento do agente em meio de cultivo (CHIODINI, 1993a; TORTORA, 2000; GOMES, 2002; LILENBAUM; MARASSI; OELEMANN, 2007).

Muitas bactérias, assim como o Map, são dependentes de ferro para sua sobrevivência e virulência. A maioria das micobactérias produz micobactina, um complexo solúvel de ferro captado pelos receptores da membrana. No entanto, Map não produz micobactina o que o torna incapaz de captar ferro fora do hospedeiro (CLARKE, 1997; GOMES, 2002). Map é um patógeno resistente a temperaturas elevadas. Variáveis quantidades de micro-organismos Map contaminantes no leite e no colostro não são totalmente eliminados pelo processo de pasteurização (CHIODINI; HERMON-TAYLOR, 1993; MEYLAN *et al.*, 1996; MILLAR *et al.*, 1996; GRANT *et al.*, 1996; HOPE; TULK; CONDRON, 1996; STABEL 1996, GRANT; BALL; ROWE, 1998; SUNG; COLLINS, 1998, KESWANI; FRANK, 1998). Map já foi isolado em amostras de leite bovino vendido comercialmente no Reino Unido (GRANT; BALL; ROWE, 2002). Outra característica importante do agente é sua capacidade de permanecer na pastagem por longos períodos, inclusive de permanecer viável por mais de um ano (LOVEL; LEVI; FRANCIS, 1944).

2.4 - Epidemiologia

A Ptb é de ocorrência mundial e acomete principalmente ruminantes domésticos e selvagens. A doença é mais frequente em animais criados de forma intensiva (RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.4.1 - Morbidade e Mortalidade

A incidência da doença de Johne em rebanhos que apresentam a enfermidade geralmente é baixa e raramente ultrapassa 5% dos animais adultos. A mortalidade anual nesses rebanhos infectados é menor que 1%, podendo chegar, em ocasiões especiais, a 5%-10%. Embora as perdas por mortalidade não sejam altas, as perdas econômicas provocadas pela diminuição da produção são consideráveis, principalmente pelo fato de ser uma enfermidade crônica e progressiva que afeta sobremaneira o desempenho e a produtividade dos animais afetados. Em bovinos, estima-se que para cada animal afetado, há cerca de 15 e 25 casos adicionais de animais portadores da infecção em diferentes estágios da enfermidade (TURNQUIST *et al.*, 1991; WHITLOCK; BUERGELT, 1996).

2.4.2 - Transmissão

A principal forma de transmissão é oro-fecal, na qual, animais infectados que eliminam o agente, contaminam pastagens e água, disseminando o patógeno para outros animais (KREEGER, 1991; SWEENEY, 1996). Map também é excretado no leite e colostro, constituindo importante via de propagação da enfermidade dentro de um rebanho (CLARKE, 1997; NAUGLE, 2003). Map já foi isolado de genitália de vacas; portanto, a transmissão intrauterina não pode ser descartada, embora lesões características de Ptb não tenham sido relatadas em fetos (SEITZ *et al.*, 1989; SWENNEY *et al.*, 1992). Alguns autores afirmam a ocorrência da transmissão transplacentária e atentam para que essa forma de transmissão seja levada em consideração nas medidas de controle em rebanhos acometidos (SCAAF; BEERWERTH, 1960; WHITTINGTON; WINDSOR, 2007). Map já foi encontrado também

no aparelho reprodutivo masculino e no sêmen (ROHDE; SHULAW, 1990; KHOL *et al.*, 2010), mas a transmissão no momento da cópula ou pelo sêmen ainda não foi demonstrada (CLARKE, 1997). A infecção ocorre, em geral, nos primeiros meses de vida e afeta clinicamente os animais a partir dos três anos de idade. Ocasionalmente, animais mais jovens são acometidos com a doença clínica (CLARKE, 1997; STABEL, 1998; HARRIS; BARLETTA, 2001; RADOSTITS *et al.*, 2007).

Apesar de cepas diferentes acometerem algumas espécies com mais frequência, a transmissão entre espécies pode ocorrer (FEIZABADI *et al.*, 1997; MUSKENS *et al.*, 2002; WHITTINGTON *et al.*, 2001; RIDEOUT *et al.*, 2003). Não existe predisposição por raça ou sexo para Ptb, o que se verifica é uma casuística maior nas raças criadas com maior frequência. O tipo de criação também favorece o aparecimento da doença, pois animais que são mantidos em maior contato, como bovinos leiteiros, têm maior possibilidade de transmissão, o que resulta no aparecimento de mais casos. Como a enfermidade ocorre mais em animais produtores de leite, conseqüentemente há maior número de relatos em fêmeas (RIDEOUT *et al.*, 2003; RADOSTITS *et al.*, 2007).

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 (MOMOTANI *et al.*, 1988). A função das células M é transportar macromoléculas e antígenos da barreira epitelial do lúmen intestinal para o tecido linfoide; no entanto, acabam, em certas ocasiões, tornando-se via de infecção para alguns patógenos (WOLF; BYE, 1984). O agente é transferido da lâmina própria da mucosa para os macrófagos, os quais, quando infectados e durante a migração para os linfáticos intestinais, espalham o agente para os linfonodos mesentéricos (MOMOTANI *et al.*, 1988), formando, assim lesões granulomatosas que podem causar má absorção (STABEL, 1998). A localização das placas de Peyer, em maior proporção no íleo, pode explicar o motivo das lesões intestinais se iniciarem nessa região (MOMOTANI *et al.*, 1988).

Na fase terminal da enfermidade, os macrófagos infectados penetram na corrente circulatória, provocando disseminação de Map para outros órgãos como fígado, rins, pulmões, úbere e trato reprodutor (SWEENEY; WHITLOCK; ROSENBERGER, 1992). Alguns

animais que se contaminam com Map podem desenvolver resistência rapidamente, controlando a infecção e não se tornando eliminadores do patógeno. Outros animais controlam a infecção parcialmente, se tornando portadores assintomáticos que liberam o patógeno, contribuindo para a disseminação da enfermidade. Há também os animais em que Map persiste na mucosa intestinal e nos linfonodos, desenvolvendo a doença (RADOSTITS *et al.*, 2007). 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; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; CARRIGAN; SEAMAN, 1990).

2.6 - Sinais Clínicos

Existem quatros 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 cultura de fezes e demonstração de Map em tecidos.

2°. Infecção subclínica, porém com perdas produtivas, como diminuição da produção de leite, diminuição da conversão alimentar, aparecimento de mastites, infertilidade, etc. Nesses animais o diagnóstico pode ser 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, 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. Pode ocorrer também, melhora temporária, principalmente quando os animais são retirados de pastagens e submetidos à dieta seca. Observa-se que o animal não responde a tratamentos.

4°. Doença clínica em estágio avançado, a qual os sinais clínicos se acentuam, levando o animal à morte. A perda de peso é muito evidente, tornando os animais 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. (RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.7 - Achados de necropsia

Os achados de necropsia mais significativos são observados no intestino, principalmente no íleo, onde pode haver espessamento de parede e enrugamento da mucosa, conferindo-lhe aspecto de circunvoluções cerebrais (BUERGELT *et al.*, 1978; DRIEMEIER *et al.*, 1999). No intestino podem ser observados, ainda, edema, avermelhamento e hemorragias petequiais. Os linfonodos mesentéricos podem estar aumentados e edemaciados (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Os vasos linfáticos podem estar evidentes e proeminentes, devido à inflamação, o que lhes confere aspecto varicoso que pode se estender desde a serosa intestinal até o mesentério. Essa característica macroscópica é presuntiva do diagnóstico da Ptb à necropsia (CHIODINI; VAN KRUIJNINGEN; MERKAL, 1984, CLARKE, 1997; DRIEMEIER *et al.*, 1999; BROWN; BAKER; BARKER, 2007). Na base do coração e nas grandes artérias, principalmente na aorta, podem ser observadas, em casos mais avançados da enfermidade, placas esbranquiçadas de mineralização. Em alguns casos, essa mineralização ocorre na parede do rúmen (DRIEMEIER *et al.*, 1999; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Em casos de enfermidade terminal, no qual o animal está caquético, pode-se observar atrofia de musculatura e gordura, além de edema na região submandibular e presença de fluidos nas cavidades torácica e abdominal (BUERGELT *et al.*, 1978; AGIRREGOMOSKORTA, 2007). Em animais que não estão em estágios muito avançados da enfermidade não se observam muitas alterações macroscópicas (CLARKE, 1997).

2.8 - Achados microscópicos

Os achados microscópicos mais específicos ocorrem nos linfonodos mesentéricos e no intestino delgado, principalmente no íleo; no entanto, em casos de infecção mais avançada, as lesões se estendem desde o duodeno até o reto (BUERGELT *et al.*, 1978; CLARKE, 1997; CHIODINI *et al.*, 1984). Há acentuada infiltração da mucosa e lâmina própria do intestino por macrófagos, células epitelioides, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e, ocasionalmente,

neutrófilos e eosinófilos. Além disso, pode haver proliferação de fibroblastos e fibras colágenas (DRIEMEIER, *et al.*, 1999; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007), além de inflamação granulomatosa em torno e no interior de vasos sanguíneos e linfáticos, que por vezes, estão dilatados. Da mesma maneira, os gânglios nervosos submucosos (plexos de Meissner) podem estar preenchidos com infiltrado mononuclear. Tais infiltrados são, por vezes, encontrados nos plexos mioentéricos de Auerbach nos feixes musculares lisos. (BUERGELT *et al.*, 1978; CLARKE, 1997; RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Lesões granulomatosas semelhantes são encontradas nos linfonodos mesentéricos (BUERGELT *et al.*, 1978; CLARKE, 1997). No fígado, pode haver atrofia hepatocelular por caquexia e microgranulomas multifocais. As lesões vasculares incluem degeneração e calcificação, nas túnicas íntima e média das artérias (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Através da coloração de Ziehl-Neelsen, pode-se verificar numerosos BAAR dentro dos diferentes tipos morfológicos de células macrofágicas (BUERGELT *et al.*, 1978; CLARKE, 1997; GOMES, 2002).

2.9 - Diagnóstico

Existem diversas técnicas diagnósticas para Ptb, podendo-se dividi-las em métodos confirmatórios da enfermidade no animal morto e métodos de detecção de animais vivos infectados (FERREIRA *et al.*, 2005). As principais técnicas confirmatórias de Ptb no animal morto incluem os achados macroscópicos de necropsia, a histopatologia, a demonstração de BAAR pela técnica de Ziehl-Neelsen, a imuno-histoquímica, o cultivo bacteriológico e a PCR (CHIODINI, 1989a; COCITO *et al.*, 1994; CLARKE, 1997; AGIRREGOMOSKORTA, 2007). O diagnóstico da doença subclínica é difícil, devido à baixa sensibilidade dos testes desenvolvidos até agora. Os exames imunológicos e moleculares podem não identificar todos os animais infectados, gerando falso-negativos e, além disso, eles podem dar um número considerável de resultados falso-positivos (COUSSENS, 2004). Isso é especialmente verdade na fase inicial da doença, quando imunoglobulinas específicas são produzidas em quantidades indetectáveis (SHIN *et al.*, 2004, LILENBAUM; MARASSI; OELEMANN, 2007). Dos métodos sorológicos, ELISA e imunodifusão em gel de agarose (AGID) são considerados os testes mais sensíveis na detecção de animais infectados (COLLINS, 1996; STABEL, 1998).

2.10 - Diagnósticos diferenciais

Ptb deve ser diferenciada de enfermidades que cursam com diarreia crônica em animais adultos, tais com salmonelose, coccidiose e helmintose gastrintestinal, as quais são doenças de curso geralmente agudo, o que as diferencia da Ptb que apresenta quadro crônico e além disso, essas doenças geralmente acometem animais jovens (RADOSTITS *et al.*, 2007). Ptb também deve ser diferenciada de deficiência secundária de cobre que também cursa com diarreia crônica (MAZZOCCO *et al.*, 2009), além de outras doenças debilitantes como má nutrição, reticuloperitonite crônica, abscesso hepático, pielonefrite, linfossarcoma e amiloidose (RADOSTITS *et al.*, 2007). Outras afecções que devem ser consideradas como diagnóstico diferencial são tuberculose (GELBERG, 2007), intoxicação por *Senecio* sp (CORRÊA *et al.*, 2008), intoxicação por flúor (RIET-CORREA *et al.*, 1983), disenteria de inverno (PAVARINI *et al.*, 2008), diarreia viral bovina (BVD) (BROWN; BAKER; BARKER, 2007), parasitoses gastrointestinais (RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.11 - Tratamento

Não existem antimicrobianos que apresentem resultados eficientes para 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 (JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997b; FERREIRA *et al.*, 2005). 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 (LARASEN *et al.*, 1950).

2.12 - Controle e prevenção

Controlar paratuberculose é muito difícil devido ao longo período de incubação e a complicada identificação dos animais infectados subclínicamente, (RIET-CORREA; DRIEMEIER, 2007). Tendo em vista que os animais se contaminam principalmente nas

primeiras semanas de vida, cuidados higiênicos devem ser mantidos para evitar que ingiram alimentos e fezes contaminados. A separação de bezerros de suas mães, logo após o nascimento, criando-os individualmente nos primeiros meses de vida é preconizada para que se controle o alimento ingerido e se evite contato com animais adultos. Outra medida recomendada é utilização de colostro ou leite de animais livres (testados negativos) na criação dos bezerros (CHIODINI *et al.*, 1984; JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997a). Testar todos os animais antes das aquisições pode evitar a compra de portadores de Map (CHIODINI *et al.*, 1984; STABEL, 1998). Em alguns países é praticada a vacinação com bons resultados e é amplamente recomendada em propriedades com prevalência elevada de Ptb (KÖRMENDY, 1994; HARRIS; BARLETA, 2001), porém sua grande desvantagem é a interferência nos resultados de testes imunológicos, inviabilizando 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). O controle da enfermidade se baseia primariamente em medidas de manejo do rebanho preventivas associadas à detecção regular de animais infectados com imediato descarte. Dessa forma, um programa que inclua testes periódicos dos animais, visando identificar os soropositivos e evitar seu contato com bezerros e o uso de seu colostro é a forma mais importante de controle da enfermidade (STABEL, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.13 - Potencial zoonótico

A doença de Crohn (DC) é uma ileíte granulomatosa crônica, e a participação de Map na sua etiologia é contraditória (CHIODINI; ROSSITER, 1996). Os principais sinais clínicos da enfermidade são diarreia e emagrecimento, semelhantes à Ptb (CHIODINI, 1989b). A análise histopatológica de material de biópsia frequentemente mostra granulomas difusos e alterações nos linfonodos semelhantes aos da Ptb bovina (SCHMITZ-MOORMANN *et al.*, 1984). BAAR são encontrados, por vezes, em granulomas de pacientes de doença de Crohn e métodos imuno-histoquímicos apresentaram resultado positivo em algumas amostras (KOBAYASHI; BLASER; BROWN, 1989). Em cultivos de biopsias intestinais, têm sido isoladas colônias de Map (CHIODINI, ROSSITER, 1996). Utilização de quimioterápicos para a doença de Crohn não têm demonstrado grandes resultados. Antimetabólitos (dapsona,

etambutol, isoniazida e sulfassalazina) e antibióticos (rifampicina, estreptomicina e viomicina) têm se mostrado praticamente ineficazes. Alguma melhora foi obtida somente quando os quimioterápicos foram administrados em combinação com certos medicamentos anti-inflamatórios esteroides (cortisona prednisolona, e metotrexato). A remoção cirúrgica da porção afetada é preconizada (CHIODINI, 1989a). Alguns autores consideram a DC como uma zoonose (CHIODINI *et al.*, 1984; CHIODINI, ROSSITER, 1996); portanto, alimentos como leite e carne de bovinos podem ser fontes de infecção (SWEENEY, 1996; STABEL, 1997; COLLINS 1997; GRANT; BALL; ROWE, 1998; RESWANI; FRANK, 1998). 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).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Dados epidemiológicos e sinais clínicos da enfermidade foram obtidos com o proprietário e através de visitas na propriedade. Foram realizadas necropsias de seis búfalos eutanasiados devido ao avançado estágio da doença. A eutanásia foi realizada conforme o prescrito pelas normas de bem estar animal (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA, lei no. 6.638, de maio de 1979). Amostras de tecidos foram coletadas durante a necropsia dos animais, fixadas em solução de formalina a 10% tamponada por 24-48 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992). Nos três últimos búfalos necropsiados foi realizada coleta segmentada de todas as porções do intestino, compreendendo duodeno, jejuno, íleo, válvula ileocecal, ceco, cólon ascendente, cólon descendente e reto. Raspados de fezes fixadas em metanol e fragmentos de intestino, fígado, linfonodos mesentéricos e hepáticos e pele foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen. Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. Em seguida, as lâminas foram cobertas pelo corante fucsina fenicada e colocadas na estufa a 45 °C por 20 minutos. Após, foram lavadas em água destilada e foi realizada a descoloração com solução de álcool-ácido por 5 segundos. As lâminas foram passadas novamente em água destilada e se procedeu o contraste com azul de metileno por 30 segundos. Subsequentemente, os cortes foram desidratados, passados no xilol e observados em microscopia óptica (PROPHET *et al.*, 1992; ZIMMER *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2008).

Fragmentos de intestino, fígado e linfonodos mesentéricos e hepáticos mantidos em blocos de parafina de todos os bubalinos foram cortados a 5µm de espessura em lâmina positivada (ImmunoSlide-EasyPath[®]) para realização de imuno-histoquímica. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada, por 15 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com protease XIV (Sigma Chemical Company, Poole, United Kingdom[®]), durante 15 minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), as lâminas foram tratadas com leite desnatado (Molico, Araçatuba, São Paulo, Brasil[®]) 5% em água destilada, durante 15 minutos. Os cortes foram incubados com o

anticorpo primário policlonal anti-*mycobacterium tuberculosis* (Genetex, GTX20905[®]) na diluição de 1:200 em PBS, durante uma hora à 37°C. Em seguida, foi utilizado anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e depois tratados com o conjugado estreptavidinaperoxidase (Estreptavidina-peroxidase LSAB, Dako, Carpinteria, California, United States of America[®]) por mais 20 minutos. Como cromógeno, utilizou-se 3,3 - diaminobenzidina (DAB) (diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, California, United States of America[®]). Controles positivos foram utilizados simultaneamente no procedimento (BRESS *et al.*, 2000; EYZAGUIRRE; HAQUE, 2008). Para isolamento bacteriano em meio de cultivo específico de Herrold enriquecido com micobactina (STABEL, 1997), foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS (LABACVET-UFRGS) amostras de íleo, linfonodos mesentéricos e fezes. A identificação do micro-organismo foi realizada de acordo com os critérios descritos por Collins (1996).

Para caracterização molecular da espécie de Map, as colônias isoladas dos tecidos dos quatro primeiros búfalos necropsiados foram submetidas à técnica de PCR IS900. Amostras das colônias foram colocadas em “eppendorf” de 2ml e diluídas em 50µL de água destilada estéril. Após, foram postas em banho maria a 100°C, por 20 minutos e encaminhadas ao Laboratório de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para realização da P.C.R. Utilizou-se o seguinte protocolo: tampão de PCR 1x; 10pmol de cada primer do IS900 de MAP P90 (5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG) e P91 (5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC); 0,4mM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl₂; 1UI de taq polimerase. A amplificação foi realizada em tubos de 500µl em termociclador com 96 lugares sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 37 ciclos compostos dos passos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 15 segundos, extensão a 72°C por 2 minuto e extensão final de 5 minutos. Os produtos de aproximadamente 400pb, foram analisados e avaliados pela eletroforese a 100V em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (WHITTINGTON *et al.*, 1998; SHIN *et al.*, 2004). Foram utilizadas como controle positivo e negativo, cepas de referência de Map e de *Mycobacterium bovis*, respectivamente, do LABACVET-UFRGS.

Para realização de sorologia foram coletadas amostras de sangue dos animais com mais de dois anos da propriedade, totalizando 142 búfalos, incluindo os seis necropsiados. Os animais foram contidos no brete, onde amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos (vacutâiner[®]) sem anticoagulantes. Em seguida, o material foi centrifugado e o soro acondicionado em tubos “eppendorf”, congelado a -20°C e encaminhadas ao LABACVET-

UFRGS. As placas de ELISA (Immunulon 2HB[®]) utilizadas foram sensibilizadas com o antígeno protoplasmático PPA-3 liofilizado extraído de *Mycobacterium* sp (Allied Monitor[®]). Foram adicionados 50µL antígeno (10mg/ml) diluídos em 10mL de tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 e incubadas a 6°C, por no mínimo 6 horas. Em seguida foram lavadas com solução salina “tween” por três vezes. A quantia de 200µL de cada amostra de soro descongelada foi adsorvida com 200µL de *M. phlei* 5mg/mL (Allied Monitor[®]) e permaneceram por 8 horas sob refrigeração. Após serem centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e 40µL do sobrenadante foram diluídos em 2mL de PBS/tween80/gelatina (PBST80G), resultando numa diluição final de 1:100. Foram colocados 100µL de soro adsorvido diluído a cada poço da placa sensibilizada, em triplicata e as placas foram incubadas por 1 hora a 6°C. Adicionalmente, foram utilizadas amostras como controle positivo e negativo (Allied Monitor[®]). Em seguida, foram lavadas por três vezes com PBST80G a 6°C e secadas. Adicionou-se, então, 100µL de conjugado anti-IgG bovino (Sigma[®]) com peroxidase produzido em coelho, diluído a 1:20000 em cada poço da placa, incubando-as durante 1 hora sob refrigeração. Após esse tempo, as placas foram lavadas com PBST80G, por três vezes e 100µL de solução tampão citrato pH 4 contendo 15µL de substrato ABTS ([2,2]azinobis[3-ethyl]benzthiazolin sulfonic acid) e 35µL H₂O₂ foram adicionados a cada poço e incubadas a 20°C, por cerca de 10 minutos. Finalmente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, utilizando-se leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MCC/340[®]) com filtro 405 nm. Os valores foram considerados quando a densidade óptica do controle positivo atingiu 0,220 + 10% e o controle negativo, 0,060. A amostra foi considerada positiva quando a média das três densidades ópticas (DO) da amostra testada, dividida pela média dos três valores do controle negativo (índice ELISA) foi igual ou superior a 2,1. O resultado foi considerado suspeito, quando se obteve índice ELISA entre 1,5 a 2,0 e negativo, quando o valor foi menor que 1,5.

4. RESULTADOS

4.1 Epidemiologia

A propriedade rural cujo rebanho foi estudado era destinada à produção de leite e carne de búfalos (*Bubalus bubalis*) da raça Mediterrâneo e Murrah e localizada no município de Guaíba, Rio Grande do Sul. O rebanho foi estabelecido em 1994 e, desde 2004 havia registros de búfalos com emagrecimento, diarreia, diminuição de produção e morte. Os animais necropsiados apresentaram variação de idade, sexo e evolução clínica conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição de idade, raça, sexo e evolução do quadro clínico dos seis búfalos necropsiados da raça mediterrâneo com paratuberculose.

	Idade	Sexo	Evolução do quadro clínico*
Bubalino 1	4,5 anos	Macho	8 meses
Bubalino 2	4 anos	Fêmea	5 meses
Bubalino 3	3,5 anos	Fêmea	4 meses
Bubalino 4	4 anos	Fêmea	7 meses
Bubalino 5	3,5 anos	Fêmea	4 meses
Bubalino 6	3,5 anos	Fêmea	6 meses

* O início do quadro foi determinado a partir do momento que iniciou a diarreia.

Os búfalos de leite eram ordenhados uma vez ao dia no período da manhã. Após a ordenha eram mantidos em pastagens compostas de campo nativo e, por vezes, *Brachiaria* spp. junto com os terneiros. Foi observado que as búfalas amamentavam diversos bezerros ao mesmo tempo (Figura 2).

Os sinais clínicos dos bubalinos necropsiados iniciavam com perdas produtivas discretas, avançando para perda de peso até a caquexia. A diarreia era inicialmente semi-líquida (Figura 3) e evoluía para líquida (Figura 4), profusa e fétida. Os animais mantinham

apetite mesmo debilitados. Os búfalos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram fraqueza muscular e impossibilidade de se levantar e manter-se em estação (Figura 5).



Figura 2 - Paratuberculose. Fêmea após ordenha receptiva à amamentação de diversos bezerros.

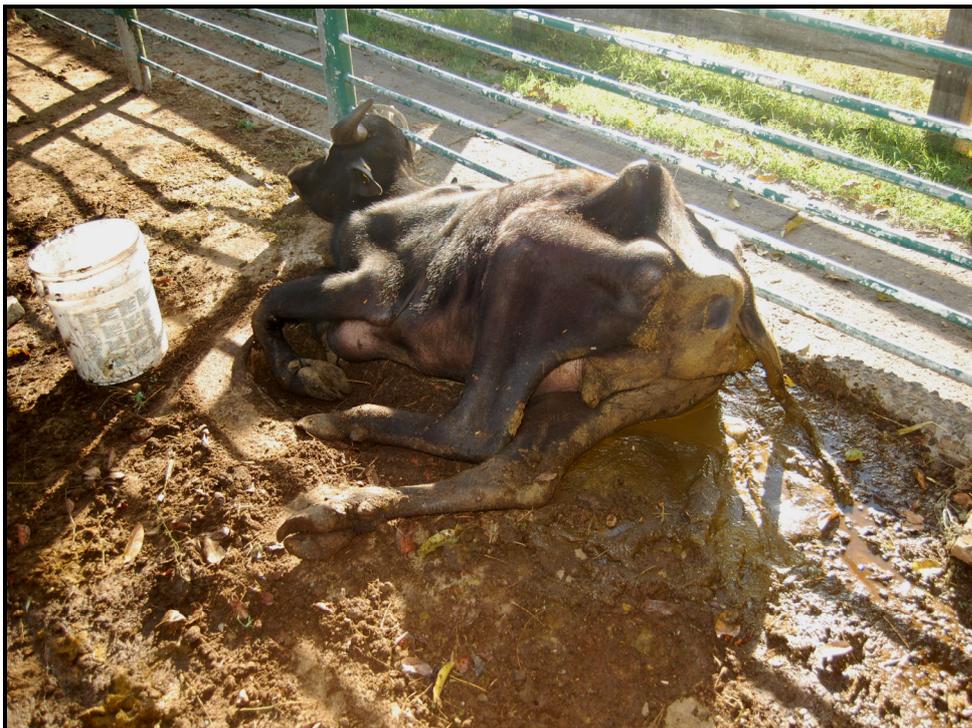


Figura 3 - Paratuberculose. Bupalino 1. Péssimo estado corporal, decúbito lateral permanente e evidência de diarreia esverdeada semi líquida.



Figura 4 - Paratuberculose. Bupalino 3. Péssimo estado corporal, decúbito esternal permanente e evidência de diarreia esverdeada líquida.



Figura 5 - Paratuberculose. Bubalino 4. Animal com fraqueza muscular e dificuldade em levantar-se.

4.2 Patologia macroscópica

Seis bubalinos foram necropsiados e os achados foram similares e caracterizados por mucosas conjuntivais e orais pálidas, caquexia, atrofia serosa da gordura epicárdica, vasos linfáticos mesentéricos evidentes (Figura 6), por vezes tortuosos esbranquiçados, sob a serosa das alças intestinais. Os linfonodos mesentéricos estavam moderadamente aumentados, com áreas escuras entremeadas com focos multinodulares brancacentos, principalmente na região cortical (Figura 7). A mucosa intestinal estava espessada e enrugada, cerebriforme tanto no intestino delgado (Figura 8), quanto no grosso (Figura 9); havia conteúdo intestinal líquido ou semi-líquido de coloração esverdeada e a válvula ileocecal estava edemaciada e espessada (Figura 10). Além dos achados descritos acima, na necropsia do búfalo 4 foram observadas placas irregulares, esbranquiçadas, opacas, rugosas e firmes no átrio esquerdo (Figura 11), no tronco aórtico, logo acima da valva semilunar e sobre a valva átrio ventricular esquerda. Alteração similar foi visualizada na serosa do rúmen dos búfalos 4 e 5. O búfalo 5 apresentava edema submandibular moderado.



Figura 6 - Paratuberculose. Búfalo 4. Jejuno. Vasos linfáticos evidentes, tortuosos e levemente esbranquiçados.



Figura 7 - Paratuberculose. Búfalo 2. Linfonodo mesentérico com região medular escura e focos multinodulares brancacentos em região cortical.



Figura 8 - Paratuberculose. Búfalo 6 Jejun. Mucosa espessada com aspecto cerebroide



Figura 9 - Paratuberculose. Búfalo 6 Ceco. Mucosa espessada e cerebriforme.

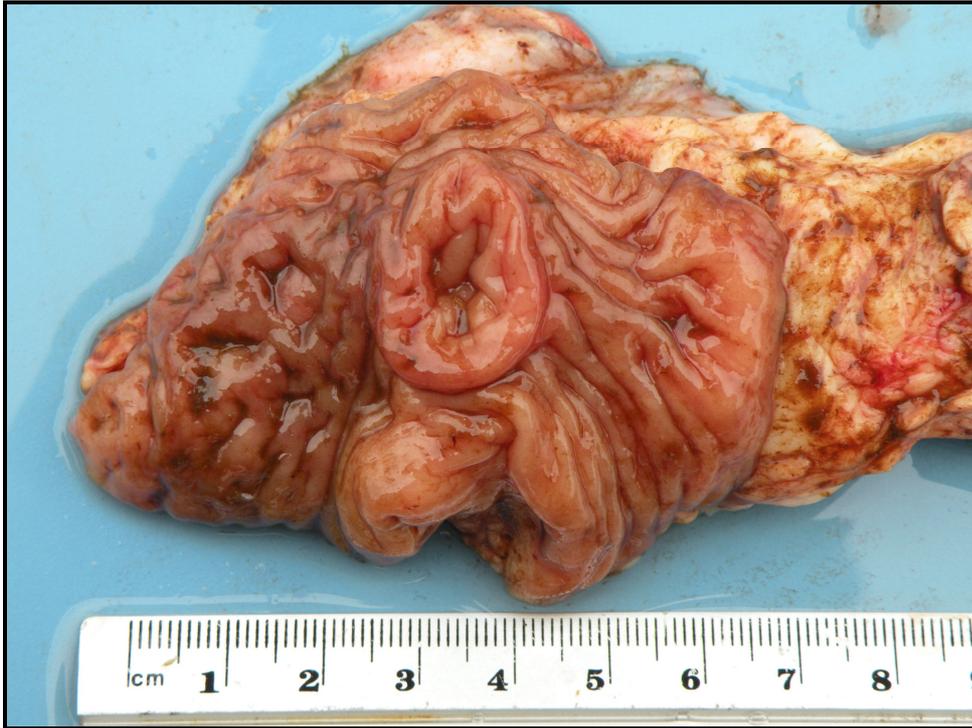


Figura 10 - Paratuberculose. Búfalo 5. Válvula ileocecal aumentada e edemaciada.

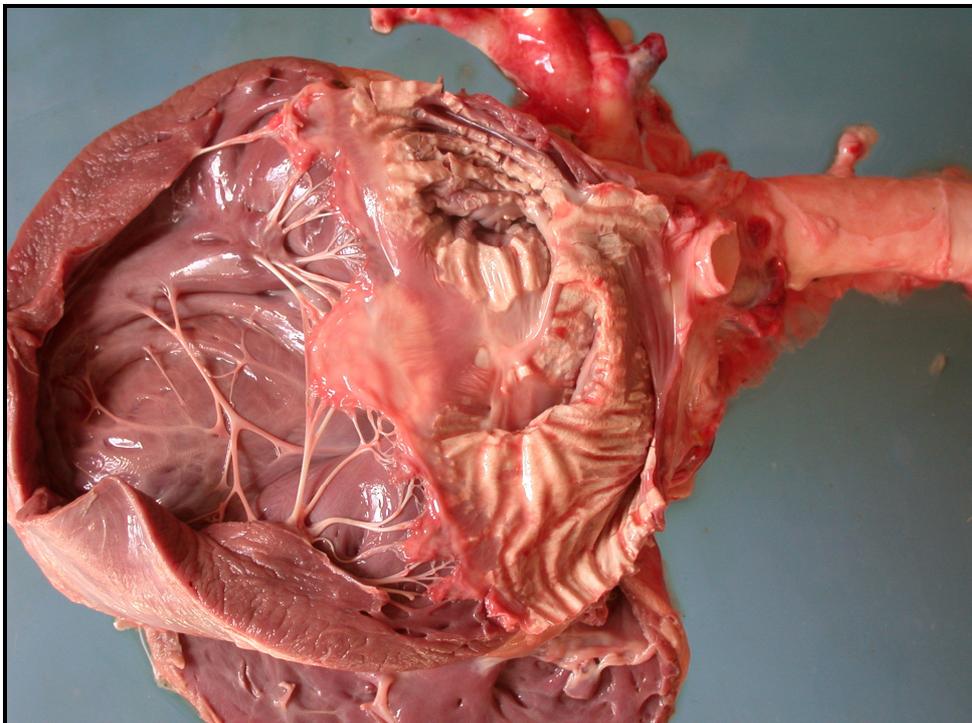


Figura 11 - Paratuberculose. Búfalo 4. Coração. Placas irregulares, esbranquiçadas de mineralização, opacas, rugosas e firmes no endocárdio do átrio esquerdo.

4.3 Patologia microscópica

As alterações histológicas observadas eram semelhantes em todos os búfalos necropsiados e foram observadas principalmente nos intestinos e linfonodos mesentéricos. Nos intestinos, havia infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos epitelioides e, em menor escala, linfócitos, plasmócitos e células gigantes tipo Langhans na lâmina própria da mucosa e na submucosa em menor intensidade. Na mucosa, os macrófagos epitelioides se encontravam principalmente em grupos predominantemente na porção apical e mediais da vilosidade e por vezes, dispersos. Atrofia e fusão de vilosidades no intestino delgado de forma acentuada e multifocal também foi observada (Figuras 12, 13 e 14). Outros achados observados na mucosa incluíram dilatação de vasos lacteais, dilatação e necrose de epitélio de criptas, preenchidas com debris necróticos e muco. Algumas criptas estavam distorcidas e alongadas e com hiperplasia epitelial. Os folículos linfóides das placas de Peyer, válvula ileocecal e intestino grosso apresentavam infiltração inflamatória de macrófagos e células gigantes (Figura 14). Na submucosa e na serosa, observou-se perivasculite, linfangiectasia, perilinfangite e linfangite granulomatosa e ocasionais vasos linfáticos com macrófagos epitelioides e células gigantes de Langhans ocluindo o lúmen de vasos (endolinfangite) (Figura 15). Proliferação fibroblástica multifocal e leve, perineurite dos plexos de Meissner também foram observados. Na camada muscular, havia leve infiltrado mononuclear multifocal por vezes associados à fibrose. A distribuição e intensidade das lesões intestinais nos búfalos 4, 5 e 6 estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Intensidade das lesões em diferentes segmentos intestinais dos búfalos 4, 5 e 6 acometidos pela paratuberculose.

	Duodeno	Jejuno	Íleo	VIC	Ceco	Cólon	Retos
Búfalo 4	+	+++	+++	+++	++	+++	+
Búfalo 5	+	++	+++	+++	+	++	+
Búfalo 6	+	+++	+++	+++	+	+	+

+: leve; ++: moderado; +++: acentuado

VIC: Válvula íleo-cecal

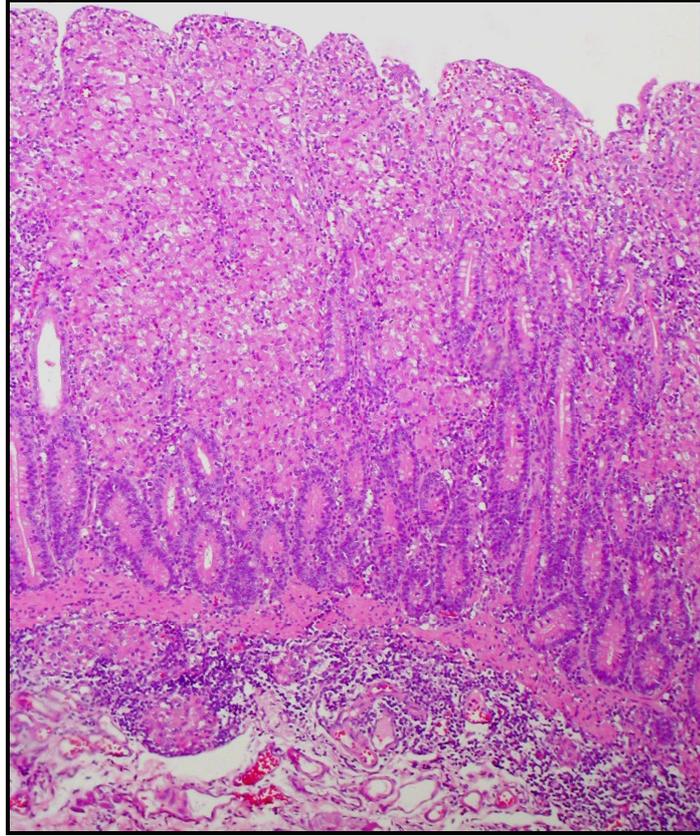


Figura 12 - Paratuberculose. Búfalo 2. Jejuno. Atrofia e fusão de vilosidades com intenso infiltrado de macrófagos epitelioides e ocasionais células gigantes na mucosa. Perilinfangite granulomatosa na submucosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 10.

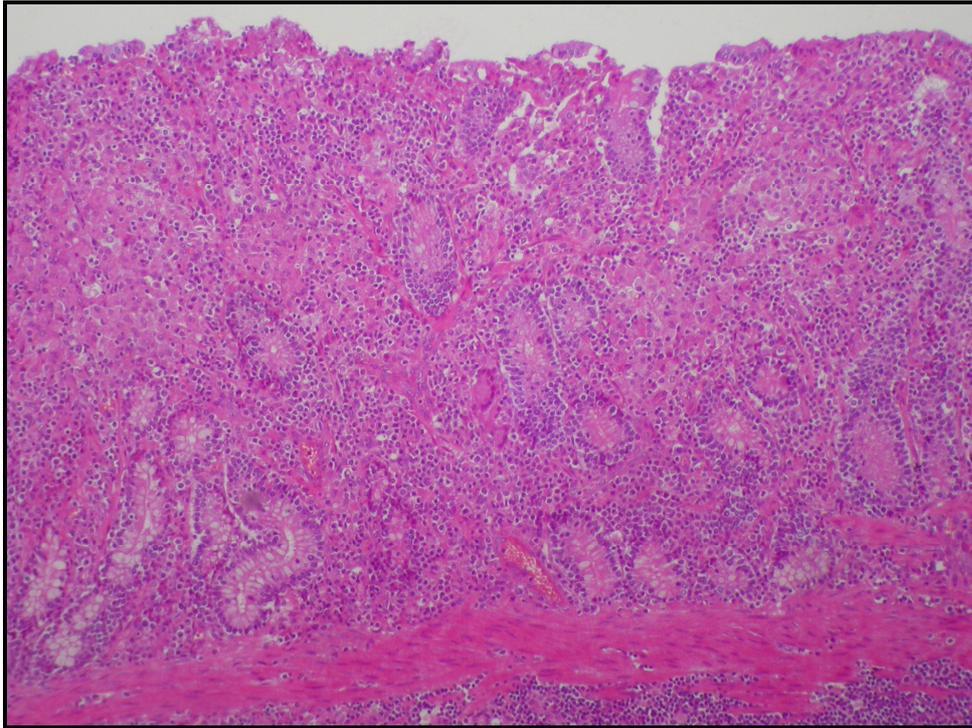


Figura 13 - Paratuberculose. Búfalo 5. Valvula ileocecal. Intenso infiltrado de macrófagos epitelioides e ocasionais células gigantes na mucosa com atrofia de vilosidades. Hematoxilina e eosina. Obj. 10.

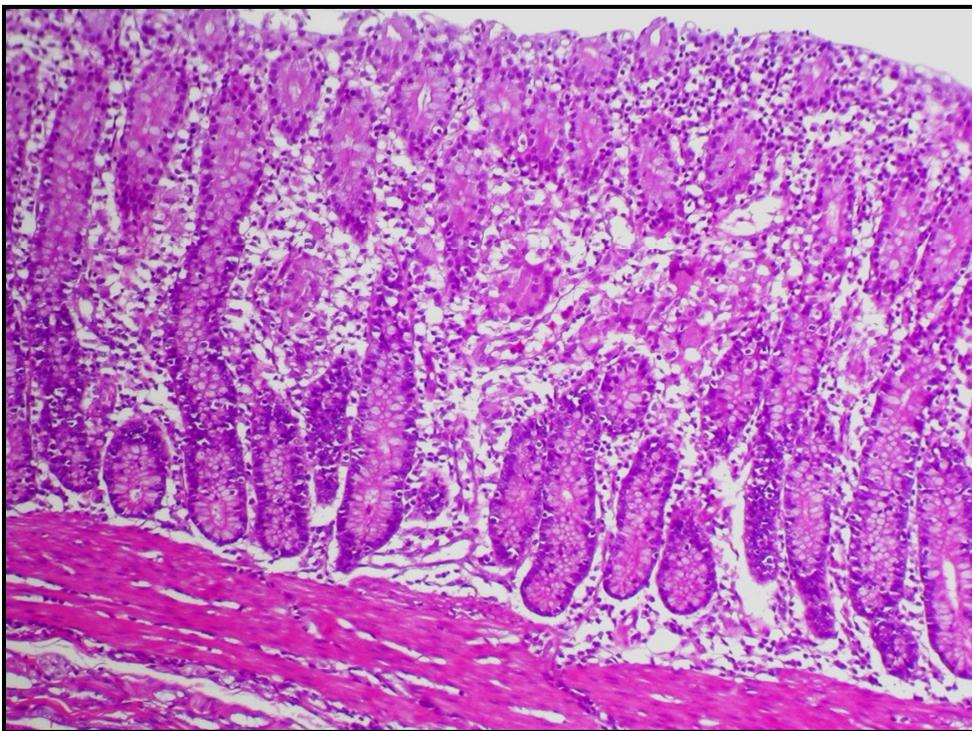


Figura 14 - Paratuberculose. Búfalo 5. Ceco. Infiltrado moderado de macrófagos epitelioides e células gigantes tipo Langhans na mucosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 20

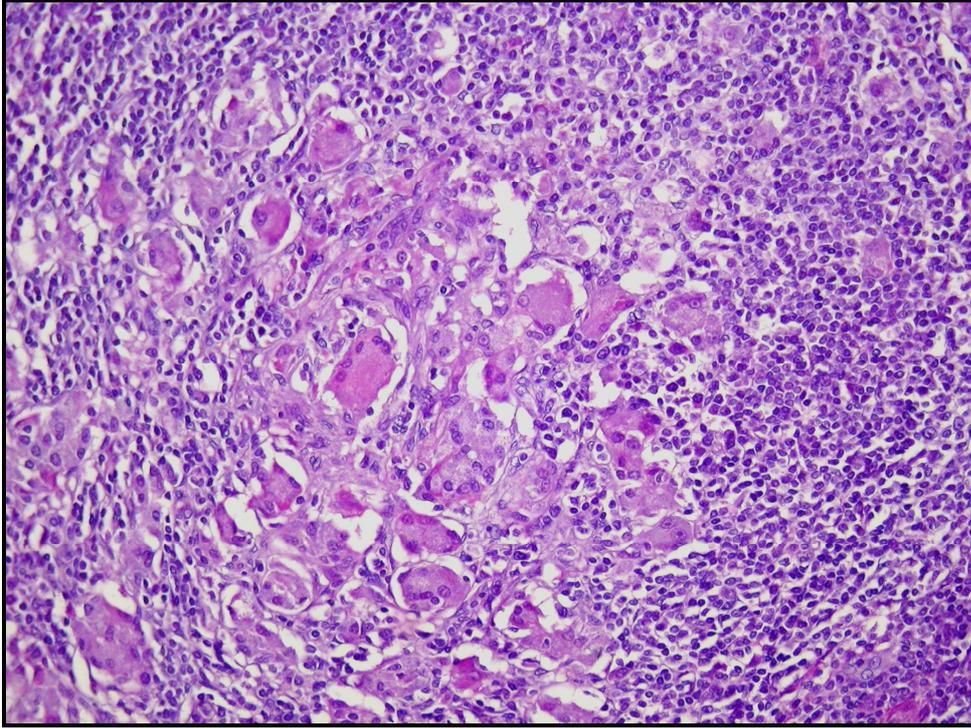


Figura 15 - Paratuberculose. Búfalo 6. Válvula ileocecal. Intenso infiltrado de células gigantes tipo Langhans em tecido linfoide. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.

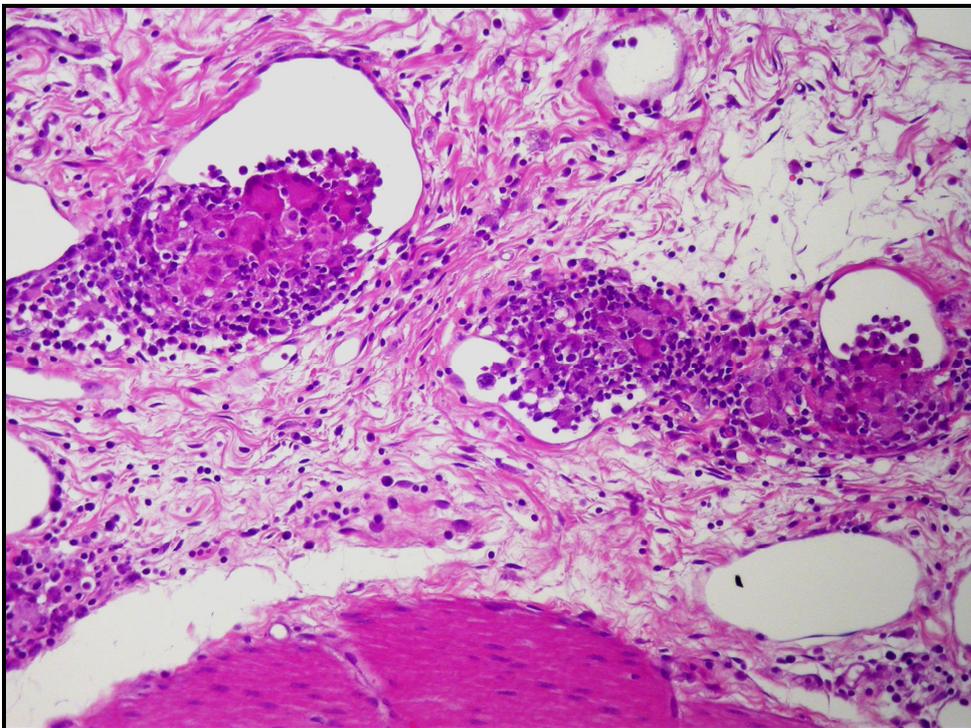


Figura 16 - Paratuberculose. Búfalo 5. Íleo. Linfangiectasia, perilinfangite e endolinfangite granulomatosa em vasos linfáticos da sub mucosa . Hematoxilina e eosina. Obj. 20.

Nos linfonodos mesentéricos, havia infiltrado de macrófagos epitelioides e células gigantes tipo Langhans multifocal nos seios subcapsulares e na região medular (Figura 17) Ocasionais vasos linfáticos subcapsulares apresentavam perilinfangite e endolinfangite granulomatosa (Figura 18).

No fígado e linfonodo hepatático dos búfalos 4, 5 e 6 foi observado infiltrado linfocitário multifocal com ocasionais células gigantes.

Nos búfalos 4 e 5 foram visualizadas mineralização difusa da serosa do rúmen (Figura 19). No búfalo 4 essa mineralização também foi observada no átrio esquerdo e tronco aortico.

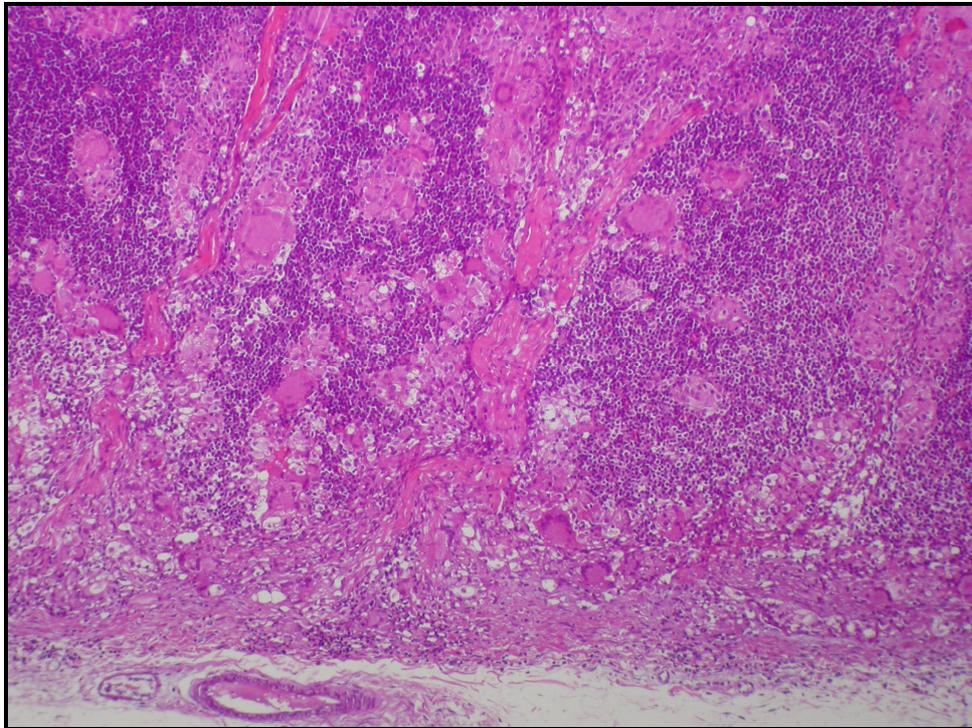


Figura 17 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Infiltrado difuso acentuado de macrófagos epitelioides e células gigantes tipo Langhans. Hematoxilina e eosina. Obj. 10.

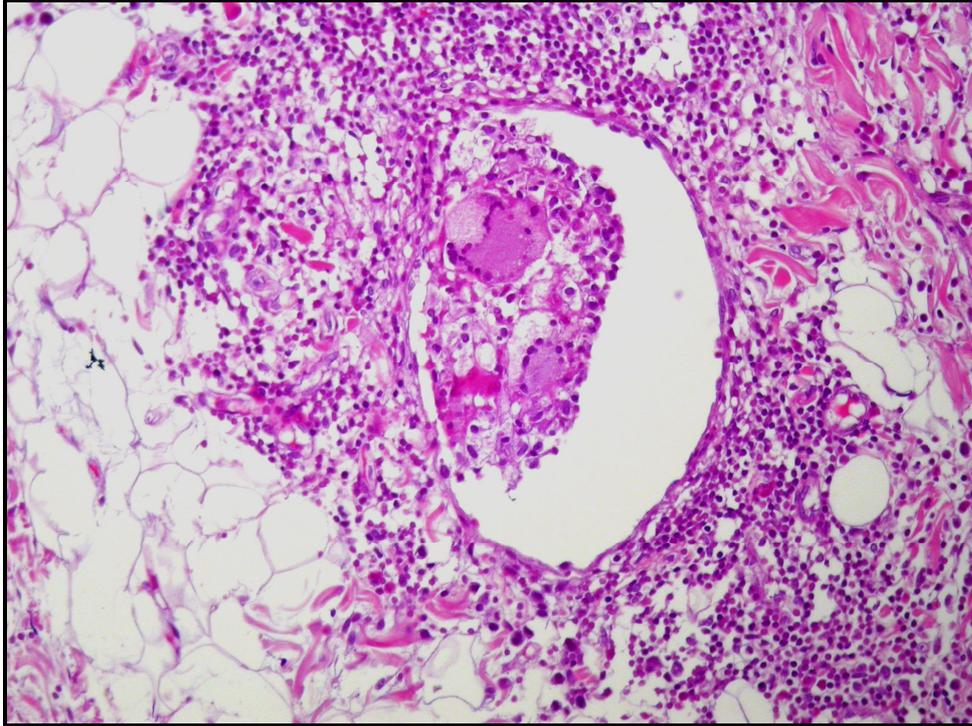


Figura 18 - Paratuberculose. Búfalo 4. Linfonodo mesentérico. Perilinfangite mononuclear, linfangiectasia e endolinfangite granulomatosa em um vaso linfático da cápsula. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.

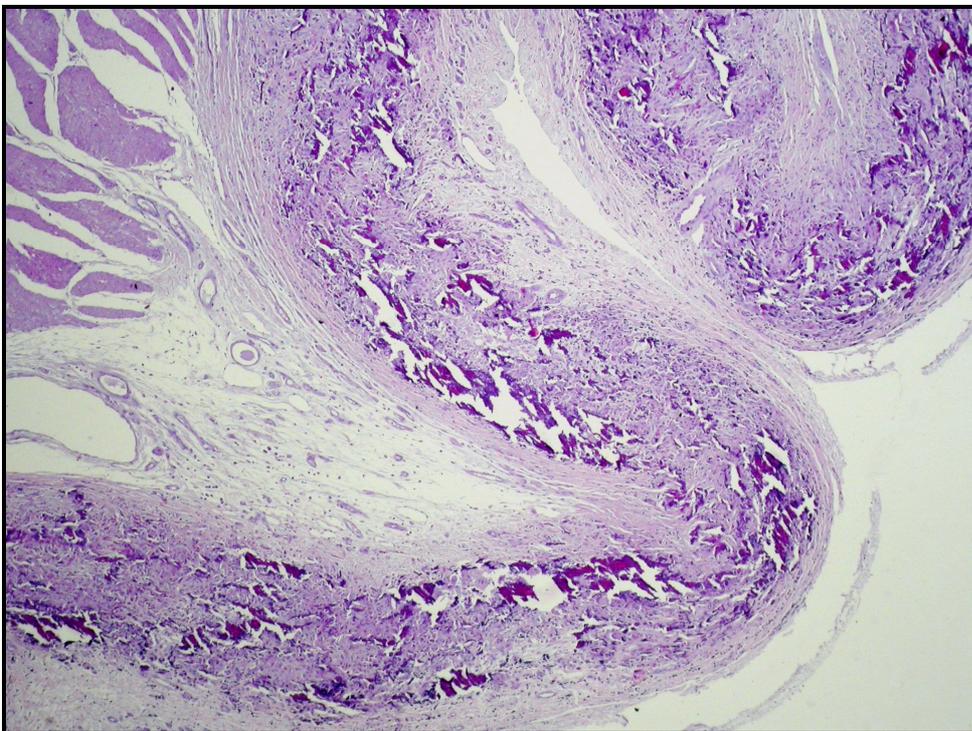


Figura 19 - Paratuberculose. Búfalo 4 Rúmen. Mineralização difusa na serosa. Hematoxilina e eosina. Obj. 4.

4.4 Ziehl-Neelsen e Imuno-histoquímica

Os cortes dos fragmentos de intestino e linfonodos mesentéricos apresentaram coloração de BAAR pela técnica de Ziehl-Neelsen (Figuras 20 e 21) e marcação positiva na imuno-histoquímica (Figuras 22 a 25) no interior de macrófagos epitelioides e células gigantes. A intensidade de coloração e marcação nas técnicas de Ziehl-Neelsen e imuno-histoquímica em diferentes segmentos intestinais dos búfalos 4, 5 e 6 apresentaram resultados semelhantes (Tabela 4). Em fragmentos de pele, fígado, linfonodos hepático e submandibular não foram visualizados BAAR na coloração de Ziehl-Neelsen, tampouco marcação positiva na imuno-histoquímica.

Tabela 3 - Intensidade de coloração de BAAR pela técnica de Ziehl-Neelsen e marcação positiva na imuno-histoquímica (IHQ) em diferentes fragmentos intestinais e linfonodos mesentéricos dos búfalos 4, 5 e 6 acometidos por paratuberculose.

	Duodeno	Jejuno	Íleo	VIC	Ceco	Cólon	Reto	Linfonodo mesentérico
Ziehl-Neelsen	0	++	+++	+++	++	++	+	+++
IHQ	0	++	+++	+++	++	++	+	+++

VIC = válvula ileocecal; IHQ = imuno-histoquímica; + = leve; ++ = moderado; +++ = acentuado

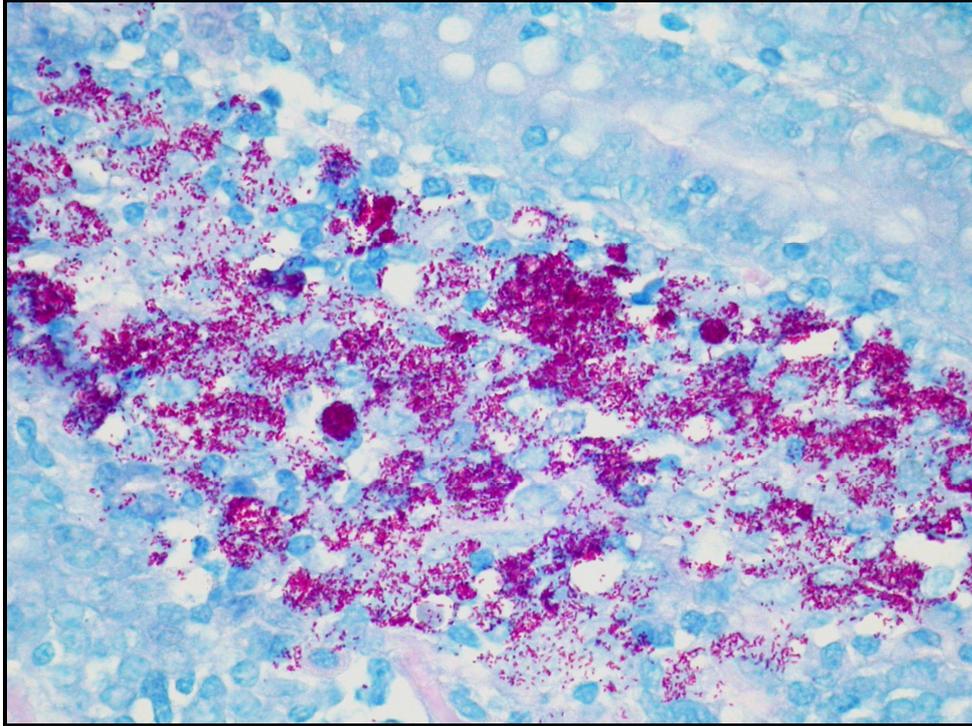


Figura 20 - Paratuberculose. Búfalo 5. Cólon. Demonstração dos BAAR no interior de macrófagos epitelioides. Ziehl-Neelsen. Obj.40.

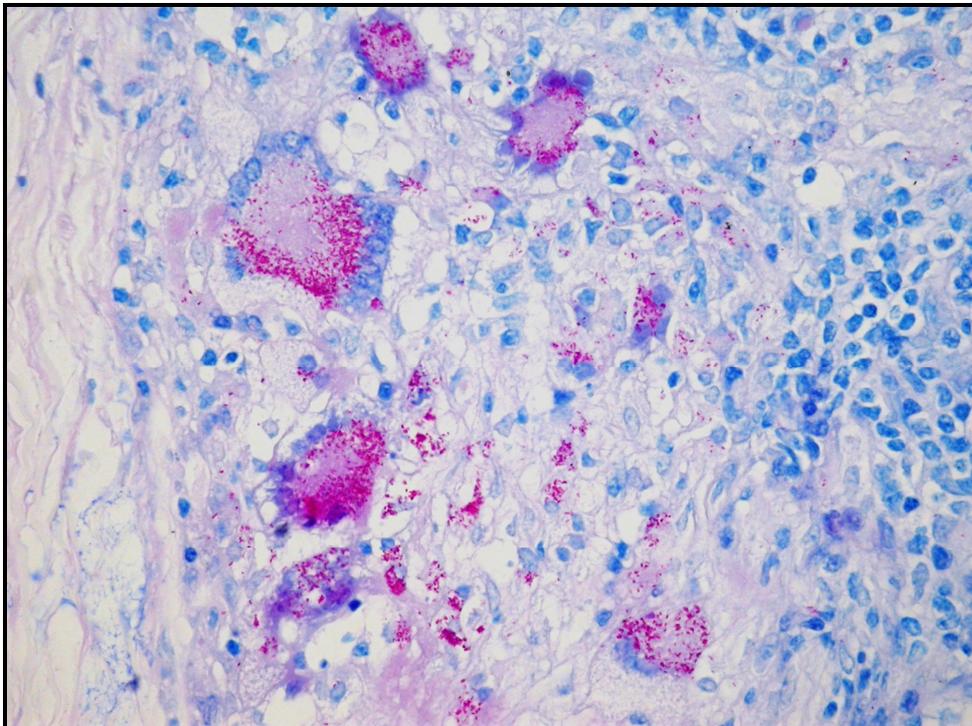


Figura 21 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Infiltrado de células gigantes com BAAR no seu interior. Ziehl-Neelsen. Obj.40.

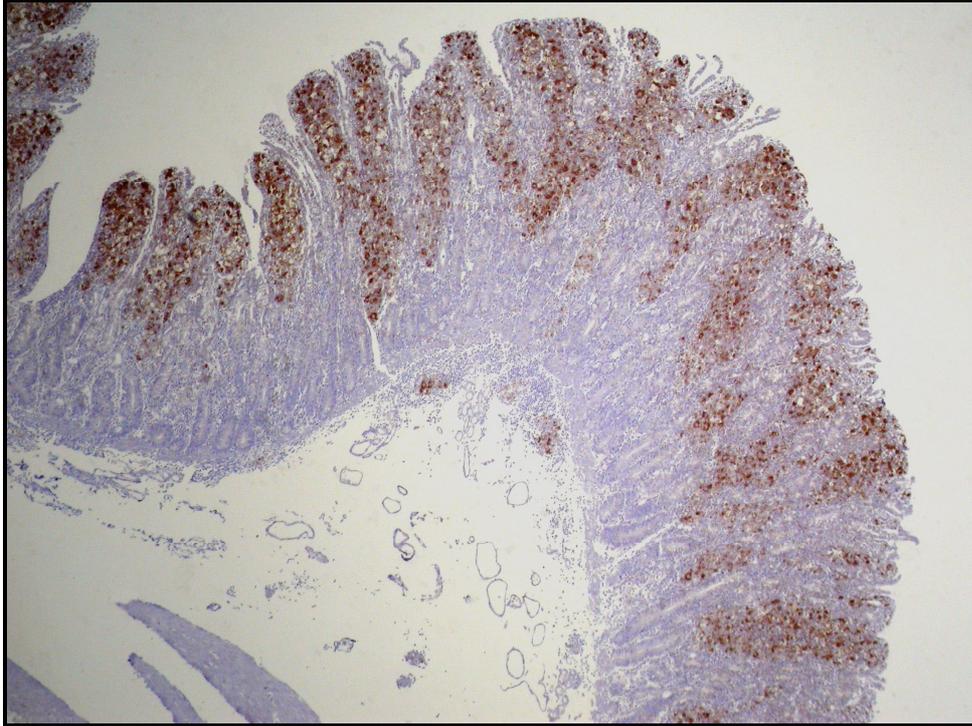


Figura 22 - Figura 3012. Paratuberculose. Búfalo 2. Jejunum. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* demonstrando antígenos predominantemente na porção apical das vilosidades. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 4.

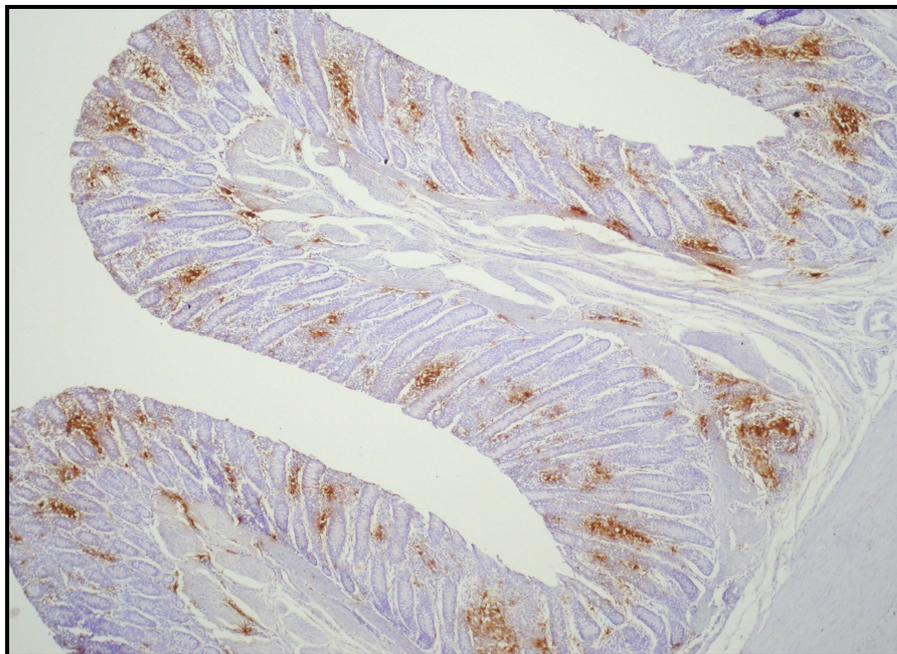


Figura 23 - Paratuberculose. Búfalo 6. Cólon. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* demonstrando a distribuição dos antígenos na mucosa e em tecido linfóide da submucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 4.

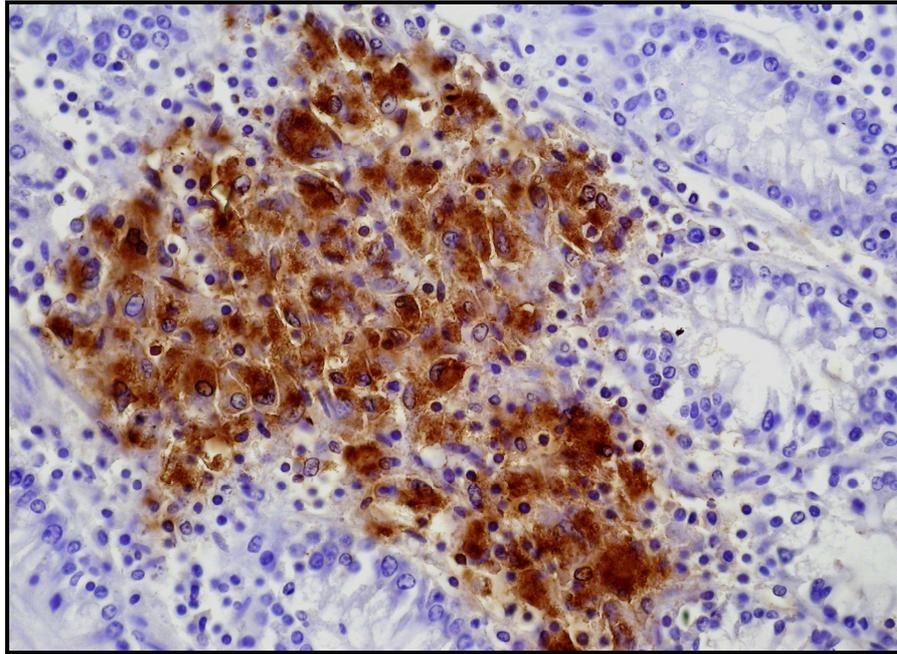


Figura 24 – Paratuberculose. Búfalo 6. Válvula ileocecal. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* demonstrando antígeno no interior de macrófagos epitelioides e células gigantes na mucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 40.

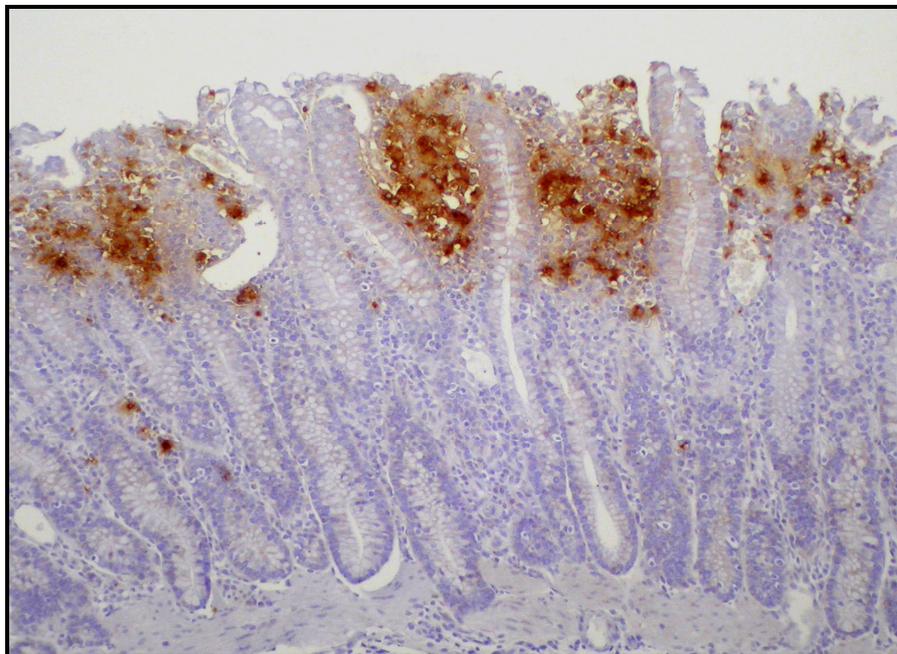


Figura 25 – Paratuberculose. Búfalo 5. Ceco. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* demonstrando antígenos na porção apical da mucosa. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 20.

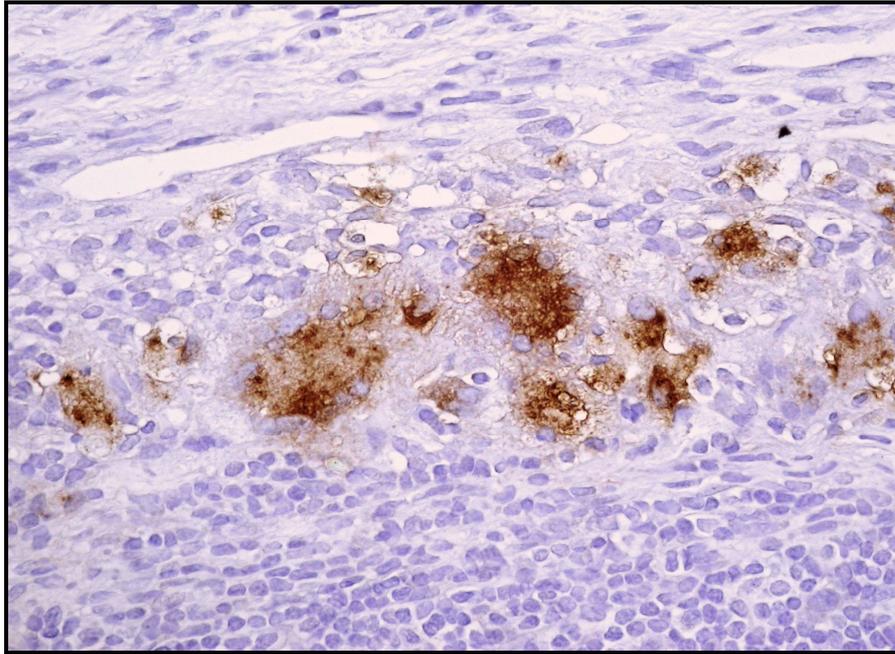


Figura 26 - Paratuberculose. Búfalo 5. Linfonodo mesentérico. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* demonstrando antígenos no interior de células gigantes na região cortical. Estreptavidina-biotina, cromógeno DAB. Obj. 40.

4.5 Isolamento Bacteriano

Os fragmentos de órgãos encaminhados ao LABACVET-UFRGS para isolamento bacteriano em meio Herrol com micobactina apresentaram crescimento de colônias compatíveis com Map, tais como crescimento lento (período superior a seis semanas), coloração álcool-ácido resistente e dependência à micobactina.

4.6 PCR

As colônias bacterianas isoladas dos bubalinos 1, 2, 3 e 4 submetidas ao exame PCR tiveram as bandas com resultado positivo para Map com amplificação de fragmentos de aproximadamente 110pb. A identidade do fragmento foi confirmada pela comparação com outras sequências de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* do LABACVET-UFRGS.

4.7 ELISA

O resultado da análise sorológica de 136 búfalos para identificação de soropositivos na propriedade está representada na Tabela 5. Adicionalmente os seis bubalinos necropsiados também apresentaram resultado positivo no teste de ELISA.

Tabela 4 - Resultados do teste de ELISA nos animais do rebanho.

	Amostras	Prevalência
Resultado positivo	21	15,45%
Resultados inconclusivos	38	27,95%
Resultados negativos	77	56,60%
Total de exames	136	100%

5. DISCUSSÃO

Neste estudo fica caracterizada e confirmada a ocorrência natural da paratuberculose em rebanho bubalino no município de Guaíba no Rio Grande do Sul, Brasil. O diagnóstico da enfermidade baseou-se nos dados epidemiológicos, sinais clínicos, achados patológicos, demonstração do agente nos focos de lesão pela coloração de Ziehl-Neelsen e imunohistoquímica, isolamento do micro-organismo *Map* em meio de cultivo específico, além de identificação através de PCR. Os sinais clínicos e alterações patológicas observados nesses casos são semelhantes aos descritos anteriormente na infecção por *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em bubalinos (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2010) e bovinos (BUERGELT *et al.*, 1978; CHIODINI *et al.*, 1984; DRIEMEIER *et al.*, 1999; YAMASAKI *et al.*, 2010). A paratuberculose tem distribuição mundial e afeta ruminantes domésticos e selvagens (MANNING; COLLINS, 2001; CVENTNIC *et al.*, 2002). A doença foi diagnosticada em bovinos, bisões, camelídeos e cervídeos (BUERGELT *et al.*, 1978, KRAMSKY *et al.*, 2002). No caso da Ptb em búfalos, os registros incluem Itália (LILLINI *et al.*, 1999) e Índia (SIVAKUMAR *et al.*, 2006). No Brasil, apesar da bubalinocultura ter destaque econômico em determinadas regiões do país, a enfermidade possui somente um relato recente Pernambuco (MOTA *et al.*, 2010). No presente estudo na propriedade havia bubalinos que apresentavam perda de peso e diarreia desde 2004. Os animais afetados eram separados e descartados pelo proprietário, porém devido ao grande aumento no número de bubalinos acometidos, o produtor solicitou ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), diagnóstico da condição. Apesar de búfalos

serem considerados mais resistentes à paratuberculose que outras espécies (SIVAKUMAR *et al.*, 2006), esse aumento no número de casos ocorreu, provavelmente, devido ao tipo de exploração realizada na propriedade que, além de produzir carne e leite, mantinha o rebanho em constante contato, inclusive com alimentação em canzins, facilitando a propagação da enfermidade. Outro fator fundamental na propagação da paratuberculose nesse rebanho foi associado ao fato de os bezerros serem criados em contato e mamando nas mães. Isso é devido à característica dos bubalinos que necessitam desse estímulo para manter a produção de leite. Além disso, como agravante, as búfalas são receptivas à amamentação de bezerros de outras búfalas. Sabe-se que a infecção ocorre principalmente nos primeiros dias de vida (LARSEN; MERKAL; CUTLIP, 1975; STABEL, 1998) e, portanto, nesse caso, a disseminação da paratuberculose no rebanho foi rápida.

As necropsias dos bubalinos com sinais clínicos revelaram lesões semelhantes. O espessamento da mucosa intestinal, especialmente do intestino delgado se deve ao infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, que confere um aspecto cerebriforme da mucosa intestinal, o qual não desaparecia quando o intestino era distendido. Já a evidenciação dos vasos linfáticos é causada pela linfangite e linfangiectasia, verificadas histologicamente. Esses dois achados são característicos de paratuberculose (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; CLARKE, 1997; DRIEMEIER *et al.*, 1999). Em um dos bubalinos necropsiados, verificou-se calcificação na base da aorta e na parede do rúmen atribuída por alguns autores a uma alteração do metabolismo de cálcio causada por macrófagos ativados em doenças granulomatosas, como as causadas por organismos *Mycobacterium* (ALIBASOGLU; DUNNE; GUSS, 1962; BUERGELT *et al.*, 1978; SHARMA, 2000). A mineralização de alguns vasos também é observada em animais de idade avançada e em animais com doenças caquetizantes, podendo ser considerada achado de necropsia (KITZ, 1927; ROBINSON; MAXIE, 1993; DRIEMEIER *et al.*, 1999).

Outros achados verificados foram caquexia, atrofia serosa e edema submandibular que podem ser relacionados à má absorção intestinal e à diarreia crônica. (BUERGELT *et al.*, 1978; CLARKE, 1997; DRIEMEIER *et al.* 1999). A intensidade dessas lesões variou entre os animais e pode estar relacionada ao estágio da infecção, às condições imunológicas de cada animal, à susceptibilidade individual e à cepa de Map (MENENDEZ, 1990). Lesões em outros órgãos são raramente encontradas, sugerindo que mecanismos imunes e patogênicos no intestino são significativamente diferentes dos demais locais (CLARKE, 1997).

As lesões histológicas revelaram um quadro de enterite e foram mais evidentes na porção final do intestino delgado; no entanto, se distribuíram ao longo de todo intestino, fato que condiz com o estágio avançado da enfermidade (DRIEMEIER *et al.*, 1999). Histopatologicamente, a paratuberculose se compara à lepra, na qual foram estabelecidos cinco tipos imunopatológicos principais correlacionados às lesões com a resposta imune tuberculoide, tuberculoide intermediário, intermediário, lepromatoso intermediário e lepromatoso (RIDLEY, 1974). Nas formas tuberculoides, há forte resistência à infecção detectável por testes de imunidade celular e baixa quantidade de bacilos, enquanto nas formas lepromatosas ocorre o oposto. Acredita-se em uma evolução de uma resposta tuberculoide no início da infecção até uma resposta lepromatosa. Na paratuberculose, têm sido diferenciadas as formas focais, multifocais e difusas de lesões, sendo divididas em multibacilares, linfocíticas e intermediárias com relação ao aspecto histopatológico (STAMP *et al.*, 1954; BUERGELT *et al.*, 1978; PALIWAL *et al.*, 1985; PEREZ, 1992, PEREZ *et al.*, 1997, PEREZ *et al.*, 1999, CORPA, 1999, CORPA *et al.*, 2000, GONZALEZ, 2003, GONZALEZ *et al.*, 2005). Nesse trabalho, foi observado no íleo dos bubalinos necropsiados a forma lepromatosa da enfermidade com lesões difusas devido aos animais se encontrarem em estágio avançado da enfermidade. As lesões verificadas na histopatologia do duodeno correspondem principalmente à linfangite e à linfangiectasia, com ausência de macrófagos epitelioides e células gigantes, o que está de acordo com a coloração dos BAAR pela técnica de Ziehl-Neelsen e marcação positiva pela imuno-histoquímica. Os resultados encontrados na coloração Ziehl-Neelsen e imuno-histoquímica apresentaram intensidades de marcações similares. Essas técnicas evidenciaram a presença de bacilos em fragmentos de intestino e nos linfonodos mesentéricos, servindo como ferramenta importante de diagnóstico presuntivo de micobacteriose, com a vantagem de serem métodos rápidos, principalmente quando comparados ao cultivo bacteriano.

As lesões encontradas nos linfonodos mesentéricos dos búfalos foram as mesmas descritas em bovinos (DACORSO FILHO *et al.*, 1960; DRIEMEIER *et al.*, 1999; YAMASAKI *et al.*, 2010). A mineralização na base da aorta, no endocárdio e na serosa do rúmen de um dos búfalos do presente estudo foi também relatada em bovinos (ALIBASOGLU *et al.*, 1962, BUERGELT *et al.*, 1978). A patogenia dessa calcificação não está completamente esclarecida. Lesões vasculares observadas em várias doenças causadas por micobactérias, incluindo a paratuberculose, podem ser atribuídas à hipercalcemia associada com níveis elevados de vitamina D3 (STABEL; GOFF, 1996). Sugere-se que esses

distúrbios metabólicos estejam associados às extensas lesões granulomatosas nos intestinos (ALIBASOGLU *et al.*, 1962). As alterações vasculares e a patogenia sugerida para o desenvolvimento dessas lesões são comparáveis àquelas descritas nas intoxicações por plantas calcinogênicas, cujos princípios ativos são semelhantes ao da vitamina D3 (DÖBEREINER *et al.*, 1971, RIET-CORREA *et al.*, 1987). Provavelmente o mesmo mecanismo patogênico seja responsável pela calcificação da serosa do rúmen. Calcificação da íntima das artérias foi descrita em diversas doenças caquetizantes em bovinos, incluindo paratuberculose e tuberculose, mas também é um achado de necropsia incidental em animais velhos (KITZ, 1927, ROBINSON; MAXIE, 1993). Trata-se, portanto, de uma lesão inespecífica.

O crescimento de colônias compatíveis com Map em amostras de intestino, linfonodos mesentéricos e fezes permitiram a identificação do agente. As técnicas de cultivo de Map possuem algumas desvantagens tais como o prolongado tempo de incubação de aproximadamente 16 semanas, além de dois ou três dias adicionais para a preparação das amostras. Tal procedimento envolve a descontaminação, alta qualidade de controle do meio de cultura, além de altos custos dos equipamentos necessários para cultivo comparados aos das técnicas sorológicas (WHITLOCK *et al.*, 2000).

Em rebanhos altamente infectados, alguns animais adultos podem ingerir grandes quantidades da micobactéria juntamente com alimentos e/ou água, eliminá-las nas fezes e esses serem detectados no cultivo. Ainda há dúvidas quanto à infecção logo após a ingestão da micobactéria. Alguns autores acreditam que esses animais adquirem a infecção; no entanto, necessitam de longo tempo, tanto, para eliminar o agente nas fezes em quantidade suficiente para serem detectados pelo cultivo, quanto para desenvolver as lesões intestinais e apresentarem os sinais clínicos da paratuberculose (WHITLOCK *et al.*, 2000).

A PCR foi realizada a partir das colônias de Map isoladas dos tecidos dos animais necropsiados e apresentou resultado positivo em todas as amostras testadas, o que demonstra ser uma ferramenta útil para identificação do agente. Foi realizado teste de ELISA para verificação da prevalência de paratuberculose na propriedade afetada. Os seis bubalinos necropsiados apresentaram altos títulos no teste de ELISA, o que condiz com a literatura, pois em animais em estágio avançado da enfermidade a resposta imune predominante é humoral (COLLINS *et al.*, 1991; YAMASAKI *et al.*, 2010). Seis búfalos foram verificados com doença clínica durante o período do estudo e vinte e um búfalos apresentaram positividade ao exame sorológico, o que está a baixo do esperado em rebanhos bovinos nas mesmas

condições, em que se esperaria encontrar 15 a 25 animais subclínicos para cada animal com sinal clínico (SWEENEY, 1996). Porém, tal resultado pode estar associado com a maior resistência dos búfalos à infecção por Map (SIVAKUMAR *et al.*, 2006). Por outro lado, a prevalência de animais soropositivos na propriedade poderia ter tido resultado um pouco inferior ao que realmente possui, pois o exame foi realizado nos animais com mais de dois anos de idade. Entretanto, os dados de prevalência encontrados por Sweeney (1996) incluíram animais com mais de três anos de idade. Com isso, deve-se considerar a possibilidade desses animais entre dois e três anos de idade apresentarem baixas concentrações de anticorpos e resultarem negativos no teste sorológico. Os búfalos com resultados positivos foram encaminhados para abate e a realização de exames de ELISA periódicos nos animais da propriedade foi recomendada como medida de controle para paratuberculose, pois detectar a infecção subclínica se faz importante na medida em que esses animais não apresentam sinais clínicos, mas eliminam o agente intermitentemente no ambiente, mantendo Map no rebanho (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984).

Os animais inconclusivos são aqueles nos quais os resultados se encontram dentro de uma margem insuficiente para afirmar que são positivos, portanto, ficaria a critério do produtor descartar imediatamente o animal ou aguardar a realização de novo exame. O teste de Elisa tem a vantagem de ser um teste rápido, porém não tem a capacidade de distinguir os animais que entraram em contato com o antígeno e o sistema imune conseguiu combater o agente daqueles que são portadores de Map e liberam o patógeno no ambiente, ou seja, se o animal apresentar resultado positivo, não significa, necessariamente, que esteja infectado. O teste de ELISA deve ser realizado para diagnóstico de rebanho, sendo de grande valia em planos de controle da enfermidade em um rebanho, mas não como ferramenta de diagnóstico individual (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984). Por outro lado, os testes sorológicos como ELISA podem apresentar resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com outras espécies de *Mycobacterium* spp., além de reações cruzadas com outras bactérias como *Actinomyces* sp., *Dermatophilus* spp., *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp., *Escheria coli*, *Corynebacterium* sp. (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; PEPIN; MARLY; PARDON, 1987).

Nesse trabalho foram relatados seis casos naturais de paratuberculose em bubalinos; entretanto, sabe-se que os búfalos são considerados relativamente resistentes à enfermidade, quando comparados com bovinos (SIVAKUMAR *et al.*, 2006). No Brasil, embora haja relatos da enfermidade em algumas regiões, a frequência com que ela aparece é baixa,

provavelmente devido às dificuldades de diagnóstico, principalmente no estágio sub-clínico da doença. Em bubalinos, há relatos na Índia (SIVAKUMAR *et al.*, 2006) e Itália (LILINI; GAMBERALE; GUARDO, 2007). Recentemente, a enfermidade foi registrada no nordeste brasileiro, em Pernambuco (MOTA *et al.*, 2010). Por isso, maior número de inquéritos epidemiológicos devem ser realizados para identificar a real prevalência da enfermidade em bubalinos no país. Sem isso, não há condições de avaliar o quadro real da enfermidade no país, nem de elaborar programas de controle. A conscientização dos médicos veterinários quanto à importância da enfermidade e a introdução de uma rotina diagnóstica é imprescindível para o controle da paratuberculose, constituindo-se em importante ferramenta para reduzir a ocorrência da enfermidade em rebanhos brasileiros. Contudo, há um excelente campo para pesquisa acerca da paratuberculose em animais domésticos, além da identificação de novas associações entre o agente, o hospedeiro e o ambiente. Mesmo sendo uma enfermidade de notificação obrigatória segundo a OIE, no Brasil não há programa de controle oficial e, isso, por vezes, dificulta o controle da enfermidade, pois depende da consciência do produtor para que sejam tomadas providências adequadas frente à paratuberculose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram a ocorrência de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* como causa de doença entérica em búfalos no Estado do Rio Grande do Sul.

O intestino delgado, intestino grosso e linfonodo mesentérico são os focos de lesão em bubalinos com paratuberculose, desses o jejuno, íleo e válvula ileocecal são as regiões mais afetadas.

A coloração de Ziehl-Neelsen e a técnica de imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*Mycobacterium tuberculosis* são métodos eficientes para detectar o agente em fragmentos de intestinos e linfonodos afetados.

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.
- AGIRREGOMOSKORTA, I.S. Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*. **Tese de Doutorado**, Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz. 2007, 230p.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. Alimentary system. In: **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007. v.2, cap.1, p.1-296.
- BUERGELT, C.D. *et al.* In vitro lymphocyte transformation as a herd survey methods for bovine paratuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.39, p.501-595, 1978.
- CARRIGAN, M.J.; SEAMAN, J.T. The pathology of Johne's disease in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.67, p.47-50, 1990.
- CHIODINI, R.J. *et al.* Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. **Digestive Disease and Sciences**, v.29, p.1073-1079, 1984.
- CHIODINI, R.J. VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinary**, v.74, p.218-262, 1984.
- 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, 1989a.
- CHIODINI, R.J. The genetic relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and the *M. avium* complex. **Acta Leprol**, v.7, s.1, p.249-25, 1989b.
- CHIODINI, R.J. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1956-1957, 1993a.
- CHIODINI, R.J. **The history of paratuberculosis (Johne's Disease) - A Review of the Literature 1985-1992**. Chiodini editor, 658p. 1993b.
- CHIODINI, R.J.; HERMON-TAYLOR, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.629-631, 1993.
- 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 Microbiology 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.
- COELHO A.C. *et al.* A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.903-908, 2010.
- COLLINS, M.T. Diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice**, v.12, p.357-371, 1996.
- COLLINS, M.T. *et al.* Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Johne's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**. v.29, n.2, p.272-276, 1991.
- COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen?. **Journal of Dairy Science**. v.80, p-3445-3448, 1997.
- CORRÊA, A.M.R.; *et al.* *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in Murrah buffaloes in Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.187-189, 2008.
- 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.
- 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.
- DIAS, L. D. *et al.* Isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 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.
- EYZAGUIRRE, E.; HAQUE, H.K. Application of Immunohistochemistry to Infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.132, p.424-431, 2008.
- FEIZABADI, M.M.; *et al.* Use of multilocus enzyme electrophoresis to examine genetic relationships amongst isolates of *Mycobacterium intracellulare* and related species. **Microbiology**, v.143, p.1461-1469, 1997.
- 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.* Paratuberculose bovina: uma mini revisão. **Revista CFMV**, v36, p.40-53, 2005.

- FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 19-24, 2001.
- GELBERG, H.B. Alimentary system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. Cap. 7, p. 301-392.
- GRANT, I.R., BALL, H.J., ROWE, M.T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.2, p.166-170, 1998.
- GRANT, I.R. *et al.* Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Cows' Milk at Pasteurization Temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.631-636, 1996.
- GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Dairy Processing Establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2428-2435, 2002.
- 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.
- GOMES, M. J. P. Aspectos epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Seropédica. 2002. 139p.
- HARRIS, N.B.; BARLETA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Review**, v.14, n.3, p.489-502, 2001.
- HOPE, A.F.; TULK, P.A.; CONDRON, R.J. Pasteurization of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. In: CHIODINI, R. J.; HINES, I. I. M. E.; COLLINS, M. T. **Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis**. Rehoboth, Mass: International Association for Paratuberculosis, p.377-382, 1996.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J.; KANEENE, J. B. Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. **Veterinary Bulletin**, v.67, n.6, 1997a.
- 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, 1997b.
- KESWANI, J.; FRANK, J.F. Thermal Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Journal of Food Protection**. v.61, p.974-978, 1998.
- 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.

- KÖRMENDY, 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.
- 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.69-171, 2000.
- LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W. M. R. Paratuberculosis: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.580-590, 2007.
- LOVEL, R.; LEVI, M.; FRANCIS, J. Studies on the survival of Johne's bacilli. **The Journal of Comparative Pathology**. v.54, p.120-129, 1944.
- MANNING, E. J. B.; COLLINS, M. T. History of paratuberculosis. In: BEHR, M.A.; COLLINS, D.M. **Paratuberculosis: organism, disease, control**. 2010, cap.1, p.1-9.
- MANNING, E.J.; COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Rev. Sci Tech OIE**, v.20, p.133-150, 2001.
- MAZZOCCO, M.B. *et al.* Molibdenose em bovinos no estado de Santa Catarina. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 14, 2009, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: [s.n], 2009. CD-ROM
- 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.
- MEYLAN, M. *et al.* Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.11, p.1580-1585, 1996.
- MILLAR, D. *et al.* IS900 PCR To Detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Retail Supplies of Whole Pasteurized Cows' Milk in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3446-3452, 1996.
- 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.
- 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.
- MOTA, R.A. *et al.* Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.237-242, 2010.

- MUSKENS, J. *et al.* Evaluation of the long term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.3, p.269-278, 2002.
- 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.
- NAUGLE, A.L. Epidemiologic investigations of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in Ohio dairy herds. Ohio. **Tese de Doutorado**. The Ohio State University, Ohio. 2003, 246p.
- NIELSEN, S.S.; TOLF, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. **Preventive Veterinary Medicine**. v.88, p.1-14, 2009.
- OLIVEIRA, D. M. *et al.* Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba. In: ENCONTRO NACIONAL DO DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 2003, Mato Grosso do Sul, 2008. **Anais**. Mato grosso do Sul: [s.n.], 2008. CD-ROM.
- OLIVEIRA, D. M. *et al.* Paratuberculose em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.67-72, 2010.
- PAVARINI, S. P.; *et al.* Achados clínico patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.12, p.611-616, 2008.
- 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. **O Biológico**, v.4, p.19-24, 1979.
- PROPHET, E.B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 279p.
- RADOSTITS, O.M. *et al.* Diseases associated with bacteria – IV. In: _____. **Veterinary Medicine**. 10. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 19, p. 1007-1060.
- 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.
- RIET-CORREA, F.; DRIEMEIER, D. Paratuberculose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J (Eds.). **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. 3ed, v 2. Santa Maria. Palloti. p.401-421, 2007.
- RIET-CORREA, F.; *et al.* Poluição ambiental como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, n.4, p.107-114, 1983.
- 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.

- ROHDE, R.F.; SHULAW, W.P. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.197, n.11, p.1482-1483, 1990.
- 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.
- SCAAF, J.; BEERWERTH, W. Die Bedeutung der Generalisation der Paratuberkulose, der Ausscheidung des Erregers mit der Milch und der kongenitalen Übertragung für die Bekämpfung der Seuche. **Rindertuberkulose und Brucellose**. v.9, p.115–124, 1960.
- SCHMITZ-MOORMANN, *et al.* The granulomatin Crohn's disease. A bioptical study. **Pathology, Research & Practice**. v.178, p.467-476, 1984.
- SEITZ *et al.* Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.194, p.1423-1426, 1989.
- 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. DiSSERTAÇÃO de mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal. 2005, 60p.
- 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.
- SIVAKUMAR, P. *et al.* Pathology of Naturally Occurring Paratuberculosis in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 455–462, 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 Diagnostician Investigation**, v.9, p.375-380, 1997.
- STABEL, J.R.; GOFF, J.P. Influence of vitamin D₃ infusion and dietary calcium on secretion of interleukin 6, and tumor necrosis factor in mice infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of veterinary Research**, v.57, p.825-829, 1996.
- STABEL, J.R. Johne's: a hidden threat. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.283-288, 1998.
- STABEL, J.R. Production of γ -interferon by peripheral blood mononuclear cell: an important diagnosis tool for detection of subclinical paratuberculosis. **Journal of Veterinary Diagnostician Investigation**. v.8, p. 345-350, 1996.
- SUNG, N.; COLLINS, M.T. Thermal Tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.999-1005, 1998.
- SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A.E. *Mycobacterium 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 American Food Animal Practice**, v.12, n.12, p. 305-312, 1996.

- 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.
- TORTORA, G.J. *et al.* **Microbiologia**. 6ª Ed. Artmed, Porto Alegre. 2000, 136p.
- TURNQUIST, S.E.; *et al.* Serologic evidence of paratuberculosis in Louisiana beef cattle herds as detected by ELISA. **Preventive Veterinary Medicine**, v.11, n.2, p.125-130, 1991.
- WHITLOCK, R.H; *et al.* ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. **Veterinary Microbiology**, v.77, p.387-398, 2000.
- WHITLOCK, R.H; BUERGELT, C. Preclinical e clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.12, n.2, p.345-357, 1996.
- WHITTINGTON R.J. *et al.* Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**. v.79, n.4, p.311-312, 2001.
- 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.
- YAMASAKI, E.M. *et al.* Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.911-932, 2010.
- ZIMMER, K. *et al.* 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. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.46, p.137-140, 1999.