



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA PARATUBERCULOSE BOVINA
NO RIO GRANDE DO SUL**

MARCOS JOSÉ PEREIRA GOMES

Sob a Orientação do Professor
Vinicius Rezende Ribeiro
e Co-orientação do Professor
David Driemeier

Tese submetida como requisito parcial para
Obtenção do grau de **Philosophiae Doctor**
Em Medicina Veterinária,
Área de concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Dezembro de 2002

.....

GOMES, Marcos José Pereira.

Aspectos epidemiológicos da paratuberculose bovina no Rio Grande do Sul.
Seropédica. RJ. UFRRJ. Instituto de Veterinária. 2002. xv. nº folhas :il.....

I. Referencia orientador. II. Referencia Instituição Instituto. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARCOS JOSÉ PEREIRA GOMES

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de **Philosophiae Doctor**, em Medicina Veterinária.

TESE APROVADA EM -----/-----/-----

Prof. Dr. Vinicius Rezende Ribeiro da UFRRJ

Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges da UFF

Prof^a Dr^a Rachel Ferreira da UFRRJ

Prof. Dr. Cláudio Andrade da UFRRJ

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini da UFES

Dedicatória

A verdade mais nova, ela somente, existe!
Até que um dia, para os mais meninos,
Vai tomando esse aspecto, entre irrisório e triste,
Dos velhos figurinos....
Das Verdades
Mario Quintana

Agradecimentos

Não te irrites, por mais que te fizerem...
Estuda, a frio, o coração alheio.
Farás, assim, do mal que eles te querem
Teu mais amável e sutil recreio...
Das Observações
Mario Quintana

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Histórico da Enfermidade	1
2. História da Paratuberculose no Brasil.....	3
3. Paratuberculose Bovina	5
4. Objetivos do Trabalho	6
II. REVISÃO DA LITERATURA	7
1. Agente	7
1.1 Classificação.....	7
1.2. Nomenclatura.....	7
1.3 Características Morfo-tintoriais.....	8
1.4 Características Culturais.....	8
1.5 Dependência à Micobactina.....	9
1.6 Resistência à Pasteurização.....	10
1.7 Resistência à Cloração.....	11
1.8 Resistência ao pH.....	11
2. Ambiente	12
2.1 Resistência à Luz Ultravioleta (UV).....	12
2.2 Sobrevivência nas Fezes.....	12
2.3 Tipos de Solo e pH.....	13
3. Epidemiologia	13
3.1 Morbidade e Mortalidade	13
3.2 Hospedeiros.....	14
3.2.1 Susceptibilidade de Idade, Raça e Aptidão.....	16
3.2.2 Resistência Genética.....	16
3.3 Distribuição e Difusão.....	17
3.4 Infecção.....	17
3.4.1 Relação Agente- Hospedeiro.....	18
3.5 Importância Econômica.....	19
3.6 Levantamentos Epidemiológicos.....	22
4. Patogenia	25
4.1 Entrada e Localização.....	25
4.2 Imunopatogenia.....	25
5. Sinais Clínicos e Lesões	29
5.1 Quadro Clínico.....	29
5.2 Lesões.....	29
5.2.1 Alterações Macroscópicas.....	29
5.2.2 Alterações Microscópicas.....	30
5.2.3 Patologia Experimental.....	31
6. Diagnóstico	32
6.1 Diagnóstico Clínico e Diferencial.....	32
6.2 Detecção do Agente.....	33
6.2.1 Descontaminação.....	33
6.2.2 Concentração.....	34

6.2.2.1 Centrifugação.....	34
6.2.2.2 Sedimentação.....	35
6.2.2.3 Filtração.....	35
6.2.2.4 Esferas Imunomagnéticas.....	35
6.2.3 Tratamento da Amostra.....	36
6.2.4 Cultivo.....	36
6.2.4.1 Cultivo de “Pool”	37
6.2.4.2 Cultivo Radiométrico.....	37
6.2.4.3 Cultivo não Radiométrico.....	38
6.2.5 Detecção Molecular	38
6.2.5.1 Sondas (IS900 e F57).....	39
6.2.6 Bacterioscopia e Histopatologia.....	40
6.2.7 Imunohistoquímica.....	41
6.2.8 Detecção Química.....	42
6.2.9 Outras Técnicas.....	42
6.3 Diagnóstico Imunológico.....	42
6.3.1 Imunidade Celular.....	43
6.3.1.1 Teste Intradérmico.....	43
6.3.1.2 Inibição da Migração Linfocitária.....	44
6.3.1.3 Transformação Linfocitária.....	44
6.3.1.4 Interferon gama (IFN γ).....	44
6.3.2 Imunidade Humoral.....	45
6.3.2.1 Fixação do Complemento (FC).....	45
6.3.2.2 Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA).....	46
6.3.2.3 Imunoenzimático (ELISA).....	47
7. Controle.....	48
7.1 Tratamento.....	49
7.2 Vacinação.....	50
7.3 Programas de Controle	51
8. Importância em Saúde Pública.....	53

III. CAPÍTULO I.....	57
ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA PARATUBERCULOSE BOVINA EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL	
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3. RESULTADOS	62
3.1 Histórico.....	62
3.2 Sinais Clínicos.....	63
3.3 Achados de Necropsia.....	64
3.4 Achados histopatológicos.....	69
4. DISCUSSÃO.....	73

IV. CAPÍTULO II.....	76
DOENÇA DE JOHNE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> (Map) E, SUA INFECÇÃO EM REBANHO LEITEIRO, NO RS.	
1. INTRODUÇÃO.....	78
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1 Histórico do Rebanho.....	82
2.2 Colheita de Amostras.....	82
2.3 Baciloscopia.....	82
2.4 Tratamento da Amostra e Cultivo.....	83
2.5 Identificação do agente.....	83
2.6 Sorologia.....	83
2.7 IDGA.....	84
2.8 ELISA.....	84
2.9 Análise Estatística.....	85
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4. CONCLUSÕES.....	91
V. CAPÍTULO III.....	92
PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO CAUSADA PELO <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> (Map) EM REBANHO LEITEIROS DO RS.	
1. INTRODUÇÃO.....	94
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1 Animais.....	98
2.2 Sorologia.....	98
2.3 ELISA.....	98
2.4 Análise Estatística.....	99
3. RESULTADOS.....	100
4. DISCUSSÃO.....	101
3. CONCLUSÃO.....	101
VI-CONCLUSÕES GERAIS.....	102
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

RESUMO

GOMES, Marcos José Pereira. **Aspectos epidemiológicos da paratuberculose bovina, no Rio Grande do Sul.** Seropédica: UFRRJ, 2002. 128p. (Tese de doutorado em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Animal).

Descrevem-se os achados clínicos e patológicos da paratuberculose em uma criação intensiva de bovinos de leite no município de Capela de Santana, RS. Os sinais Clínicos foram observados em oito de um total de 345 bovinos, consistindo em diarreia crônica refratária aos tratamentos, emagrecimento progressivo e queda na produção de leite. As principais lesões macroscópicas, observadas nos oito animais necropsiados, incluíam intestino delgado com acentuado espessamento da parede e superfície mucosa de aspecto reticulado, semelhante às circunvoluções cerebrais, lesão essa perceptível, através da serosa. A luz intestinal estava preenchida com conteúdo fluido e de aspecto leitoso. Os vasos linfáticos do mesentério mostravam-se mais evidentes sendo que alguns tinham aspecto varicoso. Os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume e, ao corte, fluía grande quantidade de líquido leitoso. Focos de mineralização foram observados na íntima das artérias, nas válvulas cardíacas e na serosa do rúmen. As principais lesões macroscópicas incluíam enterite, linfadenite e linfangite granulomatosa caracterizada por infiltrado inflamatório com macrófagos, células gigantes de Langhans que continham grande quantidade de bacilos álcool-ácido-resistentes. As lesões vasculares consistiam em degeneração e mineralização das túnicas íntimas e média das artérias de grande calibre associada a proliferação de colágeno. Havia calcificação da serosa do rúmen atrofia hepatocelular difusa e hepatite granulomatosa multifocal. O *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) foi isolado em amostras de intestino e linfonodos de 8 vacas Holandesas (3,5%) com doença de Johne, dentre 229 amostras cultivadas provenientes de um rebanho leiteiro. Amostras inoculadas em HEYM com micobactina produziram colônias identificadas como Map, segundo as características fenotípicas próprias como: crescimento lento, coloração álcool-ácido-resistente (A.A.R.) e dependência a micobactina. O laboratório de Referência da OIE confirmou a amostra isolada. Não houve isolamento do agente em 221 amostras intestinais quando processadas, após 2 anos de sua colheita. O teste de IDGA aplicado como “screening”, detectou 26 vacas (11,4%) positivas, dentre 228 animais testados e sacrificados em matadouro. O teste de ELISA adsorvido, utilizando o antígeno PPA-3 detectou 125 (39,8%) amostras positivas. O ELISA não adsorvido detectou mais 32 (10,1%) reagentes positivos, dentre os 314 bovinos testados. A prevalência da infecção causada pelo Map em 36 rebanhos leiteiros procedentes de 25 municípios do Rio Grande do Sul foi estimada em 44,6% das 1316 amostras testadas. A infecção foi identificada em 35 (97,2%) dos 36 rebanhos testados e presentes em todos os municípios incluídos. A ocorrência da doença de Johne foi enfatizada, tanto a forma clínica quanto a infecção subclínica no Rio Grande do Sul, sugerindo a adoção de medidas de controle sejam aplicadas na proteção dos rebanhos leiteiros nacionais.

Palavras chave: Paratuberculose bovina, Map, diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

GOMES, Marcos José Pereira. **Epidemiologic aspects of bovine paratuberculosis in Rio Grande do Sul –RS**. Seropédica: UFRRJ, 2002. 128p PhD thesis in Veterinary Science.

The clinical and pathological aspects of bovine paratuberculosis in a dairy herd in the county of Capela de Santana, Rio Grande do Sul, southern Brazil are described. Clinical signs in eight cows out 345 cattle included chronic diarrhea refractory to treatment, progressive emaciation and decreased milk production. Necropsy findings included severe and diffuse thickening of the mucosa of the small intestine with exaggerated reticular pattern, reflected in the serosal surface, similar to cerebral gyri. Intestinal loops were filled with whitish watery contents. The lymphatic vessels of the intestinal serosa and of the mesentery were thickened and tortuous. The mesenteric lymph nodes were enlarged and, on cut surface, there were oozing of milky fluid. Plaques of mineralization were evident in the intima of larger arteries, in the endocardium of the heart valves and in the ruminal serosa. There was also edema of abomasal folds and atrophy of caudate lobe of the liver. The main histopathological findings were granulomatous enteritis, lymphadenitis and lymphangitis. The inflammatory infiltrate was composed of macrophages, epithelioid cells and Langhan's giant cells containing large numbers of acid-fast bacilli. Vascular lesions included degeneration, calcification and collagen proliferation of the intima and media of larger arteries. Other microscopic lesions included calcification of the ruminal serosa, diffuse hepatocellular atrophy and multifocal granulomatous hepatitis. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) was isolated from intestines and lymph nodes samples obtained from 8 Holstein cows (3.5%) with Johne's Disease among 229 inoculated samples from a unique dairy herd in Rio Grande do Sul State, South Brazil. Cultures on HEYM supplemented with mycobactin yielded colonies identified like Map by phenotypic properties: Slow growth, acid-fast stain and mycobactin dependency. OIE Reference Laboratory in Argentine confirmed the strain like Map. The attempts to isolate the agent from 221 intestinal samples processed after 2 years were unsuccessful. The AGIDT applied as a screening test detected 26 positive cows (11.4%) among 228 tested animals at slaughterhouse. The absorbed ELISA test using PPA-3 antigen detected 125 positive animals (39.8%) and 47 (14.9%) suspect samples among 314 animals tested. Nonabsorbed ELISA test detected more 32 (10.1%) positive animals and 18 (5.7%) suspect samples than absorbed ELISA test. The prevalence of infection caused by Map was estimated in 35 bovine dairy herds in Rio Grande do Sul State by absorbed ELISA using PPA-3 commercial antigen. The ELISA test identified 558 positive (44.6%) animals among 1316 samples tested. The infection was detected in 35 dairy herds (97.2%) among 36 tested and was present in all 25 countries performed. The infection by Map was disseminated in dairy herds in Rio Grande do Sul State. It's emphasized the occurrence of clinical and subclinical forms of Johne's disease in Rio Grande do Sul and should be necessity the adoption of control measures in the protection of National dairy herds.

Key words: Bovine paratuberculosis, Map, laboratory diagnosis

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. Histórico da Enfermidade

O primeiro relato detalhado da doença de Johne ou paratuberculose bovina foi realizado, na Alemanha, há 107 anos atrás, por Johne & Frothingham, que a descreveram como um caso incomum de tuberculose bovina. Uma vaca com 6 anos de idade e histórico de perda de peso e diarreia crônica foi sacrificada, pois seu quadro clínico agravara-se muito e o teste intradérmico com a tuberculina mamífera fora inconclusivo. O exame patológico foi realizado pelo veterinário da propriedade, Dr. Frederick Harnes, que constatou macroscopicamente uma enterite crônica sem sinais de tuberculose intestinal. O intestino delgado estava especialmente espessado, com a mucosa enrugada. As vísceras foram então enviadas ao instituto de patologia de Dresden, onde foram realizadas cortes sistemáticos das amostras com lesões pelo Heirich Albert Johne e pelo Dr. Frothingham, um professor visitante da unidade de patologia de Boston, em Massachusetts. Eles observaram um espessamento da mucosa intestinal e gânglios linfáticos mesentéricos e no exame histológico evidenciaram parede intestinal infiltrada com leucócitos e células epitelióides associadas com células gigantes. Seções do intestino delgado revelaram grande quantidade de bacilos-álcool-ácidos nas lesões granulomatosas comparáveis à lepra. Observaram inúmeros bastonetes nos tecidos lesionados quando utilizaram a coloração a.a.r. Eles foram incapazes de reproduzir a doença em cobaias, concluindo que a doença era causada pelo bacilo da tuberculose aviária e por sua similaridade à tuberculose intestinal propuseram o nome de enterite pseudotuberculosa. Por volta de 1900, esta enfermidade era reconhecida não como uma enfermidade nova, mas uma doença que estava distribuída entre rebanhos bovinos do mundo inteiro. Bang avaliou criticamente a doença, reconhecendo que embora fosse semelhante à tuberculose intestinal, ela era uma entidade diferente, propondo o nome de paratuberculose. Em 1906, Freger descreve a doença como uma enterite hipertrófica crônica que McFadyean chamou-a de Doença de Johne. Ainda nesta década, Bang reconheceu que a tuberculina aviária poderia ser utilizada como reagente no diagnóstico da doença e, que havia relação com o bacilo da tuberculose aviária, mesmo antes do isolamento do agente. Twort em 1910-11 isolou o agente da paratuberculose, devido em parte, a sua displicência no tempo de observação dos tubos inoculados e, pela inspeção apurada dos tubos inoculados

resultaram na observação do crescimento de colônias satélites, crescendo em culturas contaminadas com o bacilo do feno, o *Mycobacterium phlei*. Mais tarde, ele incorporou esse ingrediente ao meio de cultura, sendo capaz de isolar um novo bacilo álcool-ácido-resistente (B.A.A.R.) que denominou de “*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*”. Holt isolou também o agente e o denominou de “bacilo da paratuberculose”. Em 1916, McFadyean denomina de “jonina” o produto equivalente à tuberculina. Nos anos subseqüentes, houve um grande acúmulo de conhecimentos, especialmente na avaliação de testes diagnósticos, no cultivo do agente e, na descrição da doença clínica. Nos anos 20, a Doença de Johne era descrita na África e Ásia e tiveram início, na França, os primeiros estudos por Vallee e Rinjard com a inoculação desses antígenos nos animais e, no desenvolvimento de vacinas. Em 1923, na primeira edição do Manual Bergey esse agente foi oficialmente chamado de *Mycobacterium paratuberculosis*. Nesse mesmo período, foram desenvolvidos estudos intensivos sobre o modelo da doença em animais de experimentação, entretanto a maior descoberta desse período foi o impacto produzido pela descoberta e isolamento da cepa 18 do *M. avium* subsp. *paratuberculosis* não dependente da micobactina. Esta cepa foi amplamente utilizada na preparação de antígenos e vacinas em estudos experimentais. Recentemente, foi provado que esta cepa é *M. avium* e não Map que por muitos anos, confundiu os dados científicos. Nos anos 30, a paratuberculose foi reconhecida na América do Sul e Índia, ficando evidente que a doença possuía distribuição mundial. Nesta década ficou evidenciado que a enfermidade era uma ameaça a atividade pecuária, principalmente pela forma de difusão e, possuindo uma resistência idade-dependente. Nos anos 40, a paratuberculose era reconhecida não somente como um problema apenas dos animais domésticos, mas também dos animais silvestres. Ela fora reconhecida como compartilhando muitas semelhanças com a lepra humana. As avaliações dos testes diagnósticos levaram a descoberta de reações cruzadas, resultando em reações falso-positivas com organismos do gênero *Corynebacterium* e outras espécies antigenicamente relacionadas. Nos anos 50 foram avaliadas as medidas de controle da doença com numerosos experimentos em vacinação. Várias cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* foram reconhecidas, incluindo variantes pigmentadas e cepas que falharam no crescimento em meios de cultivo *in vitro*. Nos anos 60, outros ensaios diagnósticos foram criados, incluindo a migração de leucócitos e teste de imunofluorescência. Grandes esforços foram

novamente realizados na busca de modelos animais para a doença. Nesta década foi reconhecida a participação de animais subclínicamente infectados (carreadores) eliminavam ativamente o *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pelas fezes. Ainda nesta mesma década foram iniciadas as primeiras investigações sobre a imunologia da infecção, tentando elucidar os mecanismos patogênicos e virulência, através de inoculações experimentais em várias espécies animais. Neste período ficou evidenciado a infecção intra e trans-uterina pelo isolamento do agente do sêmen e útero. Nos anos 80 e início dos anos 90 muitos pesquisadores sugeriram o papel do Map como agente etiológico da Doença de Crohn (DC), após o isolamento do agente em amostras de intestino e gânglios linfáticos de pacientes com a enfermidade e detectando uma sequência de inserção do DNA somente encontrada no Map. Nas décadas subsequentes foi caracterizado por pequenas observações detalhadas que no seu conjunto resultaram em avanços importantes na patologia, bacteriologia, imunologia, imunobiologia vacinação, tratamento, profilaxia, manejo, controle e epidemiologia da paratuberculose assim como avanços na biologia, fisiologia e estrutura antigênica do *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (CHIODINI, 1993).

2. História da Paratuberculose no Brasil

No Brasil, a literatura sobre a doença de Johne é pequena, pontual e, na maioria dos casos, ela foi tratada como achado anatomopatológico raro em laboratórios de patologia em universidades e instituições de pesquisa (GOMES, 2002b).

O primeiro registro da doença foi realizado por DUPONT (1915), no Jornal do Commercio, que a descreveu em bovinos importados da raça Flamengo no então, Posto Zootécnico Federal, em Pinheiro, no Rio de Janeiro. Mais tarde, os achados anatomopatológicos foram publicados em “O Estado de São Paulo”, pelo Professor Antonio Carini e comunicado em reunião da Sociedade Paulista de Medicina *apud* DACORSO FILHO et al. (1960). SANTOS & SILVA (1956), no Rio de Janeiro, relataram um caso da doença de Johne em um touro da raça Holandesa, com idade de 6 anos proveniente de uma fazenda situada no município de Barra Mansa no Estado do Rio de Janeiro.

DACORSO FILHO et al. (1960) diagnosticaram a paratuberculose bovina, através de exames clínicos e patológicos em 2 animais da raça Jersey, provenientes de um mesmo rebanho com histórico da enfermidade, no município de Petrópolis. Descreve ainda outro

caso da enfermidade clínica em um touro da raça Holandesa, filho de mãe importada da Holanda de uma pequena propriedade leiteira no município de Bangu.

SILVA & PIZELLI (1961), no Rio de Janeiro, realizaram o diagnóstico de paratuberculose em bovino da raça Jersey pertencente a uma propriedade situada no município de Petrópolis. A Doença de Johne foi experimentalmente reproduzida em ovinos, inoculando uma emulsão dos gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal de um caso de paratuberculose bovina. Dos 5 ovinos inoculados, 4 (80%) apresentaram resposta a infecção oral pelo *M. a. paratuberculosis* de origem bovina.

PORTUGAL et al. (1979), em Santa Catarina, relataram 2 casos de paratuberculose bovina. Um em touro da raça Normanda, autóctone, com 5 anos de idade, no município de Brusque e outro em uma fêmea da raça Holandesa importada da Holanda com 6 anos de idade, no município de Florianópolis.

RAMOS et al. (1986), no Rio Grande do Sul, registraram a forma clínica da enfermidade em um touro da raça Holandesa, doador de sêmen, em central de inseminação artificial.

NAKAJIMA et al. (1991), em Minas Gerais, registraram a enfermidade em uma vaca da raça Holandesa com 5 anos importada dos EUA e proveniente de Juiz de fora adquirida no Estado do Paraná.

POESTER & RAMOS (1994), no Rio Grande do Sul, reproduziram experimentalmente em caprinos com amostra de Map de origem bovina. Dos 3 animais inoculados por via oral, 2 caprinos (66,6%) apresentaram sinais da doença com o isolamento do agente, após 2 anos da inoculação. Mais tarde, DRIEMEIER et al. (1999), em Capela de Santana, Rio Grande do Sul, descreveram as lesões clínico-patológicas observadas em 8 vacas com a doença de Johne, em um rebanho com 345 animais, sendo o seu núcleo formador, vacas importadas da Argentina.

As primeiras estimativas epidemiológicas, envolvendo uma preocupação com a paratuberculose bovina ou doença de Johne são recentes e bem escassos. RIVERA (1996), no Mato Grosso do Sul, estimou em 45,5% das 639 amostras testadas pelo ELISA em 5 rebanhos de corte com animais com problemas reprodutivos. Estimou em 65% a prevalência da infecção, dentre 40 animais testados de 4 rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. LARANJA DA FONSECA et al. (2000), em São Paulo, utilizando o teste de ELISA

comercial americano estimaram a infecção em 37,9% das 403 vacas testadas em 20 rebanhos leiteiros. FERREIRA et al. (2001) no Rio de Janeiro, estimaram em 18% das 1004 amostras, através do kit comercial de ELISA australiano. GOMES et al. (2001), no Rio Grande do Sul, isolaram e identificaram o Map em amostras de 8 vacas com a doença de Johne de um plantel importado da Argentina. Estimaram a infecção em 39,8% dos 314 bovinos testados, através do teste de ELISA adsorvido. O teste de IDGA detectou 26 animais positivos (11,4%) entre os 228 testados.

Alguns artigos publicados em revistas do produtor de leite (LARANJA DA FONSECA et al. 1998 ; PITOMBO, 1999 ; GOMES, 2002ab), tendo como base informações gerais obtidas de pequenos estudos, parecem ter suscitado alguma curiosidade dos produtores, interessados e colegas veterinários.

3. Paratuberculose bovina

A doença de Johne ou paratuberculose bovina é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), caracterizada por lesão intestinal granulomatosa crônica, que acomete principalmente ruminantes domésticos e silvestres. A doença leva a síndrome de má absorção conseqüência esta atribuída às graves alterações metabólicas provocadas pelo processo inflamatório crônico, especialmente na última porção do intestino delgado, válvula ileocecal e ceco. No gado leiteiro a doença é caracterizada clinicamente por diarreia intermitente, manutenção do apetite, rápida perda de peso, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, queda abrupta na produção de leite, aumento de doenças concorrentes, caquexia e morte, após uma longa fase assintomática ou pre-clínica em o hospedeiro elimina uma gigantesca quantidade de Map no ambiente, através das fezes. Uma vez no ambiente, o agente depende de sua habilidade em persistir no ambiente até a ingestão por outro hospedeiro susceptível. Como a infecção continua sua difusão dentro e entre populações animais o nível do Map aumenta em alimentos ou produtos in natura de origem animal e no ambiente. Este fato fornece oportunidade de expor outras espécies animais, incluindo o homem que não havia sido considerado como possível hospedeiro do Map, e assim, pondo em risco rebanhos de outras espécies, além da possibilidade de veicular o agente, através de alimentos contaminados para o homem tornando-se mais um risco a Saúde Pública.

A motivação para estudar a paratuberculose bovina ou doença de Johne deveu-se principalmente ao nosso envolvimento com vários casos da forma clínica da doença em rebanho bovino com 350 vacas importadas da Argentina, numa propriedade leiteira do município de Capela de Santana, interior do Rio Grande do Sul, em 1997-8. Além disso, minha ignorância quanto a esta enfermidade; a falta de informações e respostas relevantes para serem dadas ao produtor que desesperado arcou com os prejuízos, inviabilizando um projeto de produção de leite tipo A; o desconhecimento de nossas autoridades sanitárias e o escasso número de relatos em nosso Estado e país.

4. Objetivos

Nosso trabalho teve como objetivos: a) Descrição dos aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos leiteiros no Rio Grande do Sul. b) Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) de animais com a doença ou subclínicamente infectados, quantificando sua infecção em rebanho bovino sabidamente infectado. c) Estimar a prevalência da infecção causada pelo Map, através da sorologia em diferentes rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. Agente

1.1 Classificação

O *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) THOREL et al. 1990, pertence ao gênero *Mycobacterium* LEHMANN & NEUMANN, 1896, da família *Mycobacteriaceae* CHESTER, 1897, da ordem *Actinomycetales*, classe *Thallobacteria* MURRAY, 1986, divisão *Firmicutes* GIBBONS & MURRAY, 1978, reino *Procaryotae* MURRAY, 1968 (WAYNE & KUBICA, 1986).

1.2 Nomenclatura

Map é a atual denominação do agente etiológico da paratuberculose ou doença de Johne. O agente foi isolado por Twort e originalmente denominado como *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculose bovis johne*. Posteriormente, o agente foi denominado diferentemente por pesquisadores e estudiosos de *Mycobacterium johnei* e *Mycobacterium paratuberculosis*. Mais recentemente, THOREL et al. (1990) propuseram uma nova denominação, após uma criteriosa análise taxonômica do *Mycobacterium avium*, *M. paratuberculosis* e do *M. silvaticum*, publicando os seus achados no “International Journal of Systematic Bacteriology” (IJSB). Naquela descrição, foi proposto que estas espécies fossem agrupadas juntas como *Mycobacterium avium* e separadas pelas designações de subespécie, isto é, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Desde que o IJSB é o periódico do Comitê de Bacteriologia Sistemática, os artigos publicados no referido jornal tornam-se automaticamente lei taxonômica. Como tal, qualquer mudança taxonômica toma efeito na data da publicação e, assim, julho de 1990 é, oficialmente a data em que o *M. paratuberculosis* tornou-se *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Alguns autores discutem a denominação mais moderna de Map, argumentando que há diferenças fenotípicas consideráveis entre esses dois microorganismos, especialmente quanto a velocidade de crescimento, dependência à micobactina e patogenicidade. Em reconhecimento a essas diferenças e por razões históricas o nome continua sendo utilizado

como *Mycobacterium paratuberculosis* (SWEENEY, 1996 ; CHIODINI, 2000 ; MANNING & COLLINS, 2001).

1.3 Características Morfo-Tintoriais

O Map é um bastonete pequeno (0,5 x 1,5 µm), imóvel, não esporulado, aeróbico, Gram positivo e fortemente álcool-ácido-resistente (A.A.R.) (SMITH, 1969). Nas fezes e tecidos, aparecem agrupados (apinhados), sendo um forte indicativo de sua identificação. É fortemente A.A.R.; É encontrado dentro dos macrófagos e células gigantes. Colônias características (1-5mm), crescidas em placas de agar do meio Reid-Watson ou “Herrold Egg Yolk Medium” (HEYM). Eles formam colônias rugosas e despigmentadas. Possui um crescimento muito lento, sendo um microorganismo bastante fastidioso. A formação de colônias visíveis em meio sólido pode requerer mais de 4 meses de cultivo, independentemente da adição de suplementos ou aditivos. Algumas cepas podem produzir colônias com pigmentação, variando de amarelada a laranja, primariamente isoladas de ovinos (TAYLOR, 1957), entretanto podem ser isoladas de bovinos (WATT, 1954 ; STUART, 1965). Formas não A.A.R. ou fracamente A.A.R. podem ocorrer e causar dificuldades na visualização microscópicas dos organismos em tecidos com alterações patológicas (STAMP & WATT, 1954).

1.4 Características Culturais

O isolamento ou cultivo do Map foi e ainda é uma tarefa difícil, trabalhosa e demorada, mas oferece uma sustentação sólida às técnicas diagnósticas, na aplicação das medidas de controle e prevenção das paratubercoses animais. Vários meios de cultivo têm sido desenvolvidos, desde o isolamento de Map, na década de 10, desde a descrição do procedimento relatado por TWORT & INGRAM (1912) *apud* WHIPPLE et al. (1991). O meio tinha como base o ovo e a adição de *Mycobacterium tuberculosis* como aditivo necessário. Mais tarde, substituíram o *M. tuberculosis* pelo *M. phlei*, e observaram melhor crescimento. O fator nutritivo foi extraído pelo etanol aquecido e adicionado ao meio, ao invés, da suspensão do *M. phlei*. O uso do meio, tendo como base ovo, suplementado com aditivo nutricional, agora denominado de micobactina forneceu a base para os procedimentos subseqüentes para isolamento do Map. Atualmente, os principais meios de

cultivo incluem o meio modificado de HEYM constituído basicamente de peptona, sal, agar nobre, extrato de carne, piruvato de sódio, glicerina, micobactina J, e antimicrobianos (WHIPPLE et al. 1991) ou o meio de Löwenstein-Jensen (THOREL et al. 1990 ; KOETS, 2000).

1.5 Dependência a Micobactina

O ferro é um elemento essencial para a maioria das bactérias; sua disponibilidade e o seu seqüestro está associado com a sobrevivência bacteriana e virulência. O transporte do ferro em pH neutro causa problemas, pois o Fe^{+3} forma hidróxidos coloidais insolúveis. Bactérias e fungos produzem receptores de membrana específicos para o transporte do ferro, e excretam sideróforos. Sideróforos são complexos solúveis de ferro que são captados por receptores de membrana da bactéria e, posteriormente liberados na célula por hidrólise do quelador (DAVIS, 1980 ; NEILANDS, 1981 ; BARCLAY, 1985 *apud* JOHNSON-IFEARULUNDU & KANEENE, 1997). A maioria das espécies do gênero *Mycobacterium spp* produzem 2 sideróforos: micobactina e exoquelina (SNOW, 1970 ; FISS et al. 1994 *apud* JOHNSON-IFEARULUNDU & KANEENE 1997). As bactérias diferem em sua habilidade em quelar o ferro. O Map é incapaz de produzir micobactina o que o torna incapaz de seqüestrar o ferro fora do hospedeiro. Esta dependência pode ser comprovada “*in vitro*” pela adição de altas concentrações de ferro ou suplementação com micobactina ao meio de cultura. BARCLAY & RATLEDGE (1983) *apud* KENNEDY & BENEDICTUS (2001) e LAMBRECHT & COLLINS (1992) demonstraram que a alteração do pH do meio ou concentração de ferro influenciara o crescimento do Map na ausência de micobactina. LAMBRECHT & COLLINS (1992) relataram crescimento ótimo em pH, variando de 5,5 a 6,0 e que as micobactérias não são capazes de utilizar ferro quando o ferro é quelado até sideróforo por outros microorganismos não relacionados as micobactérias. A dependência à micobactina pode ser resolvida pela adição de quantidades altas concentrações de ferro no meio artificial de cultivo. Entretanto, essa dependência não é considerada exclusiva do Map, existindo outras espécies que são também dependentes da micobactina, tais como o *M. avium* subsp. *silvaticum* e outras cepas do *M. avium* (COCITO et al. 1994).

1.6 Resistência à Pasteurização

A possível ligação entre o Map e a doença de Crohn no homem, tem sido objeto de grandes debates. Embora o Map ainda não seja classificado como uma zoonose, muitos pesquisadores vêm sugerindo a associação entre o Map e a doença de Crohn (CHIODINI et al. 1984b ; CHIODINI & ROSSITER, 1996).

Atualmente, há duas abordagens na pesquisa e avaliação do processo de pasteurização em amostras de leite suspeitas de conterem o Map.

A primeira foi aquela que utilizou o processo de pasteurização e amostras de leite contaminadas laboratorialmente com diferentes concentrações da micobactéria. CHIODINI & HERMON-TAYLOR (1993) e MILLAR et al. (1996) apresentaram evidências de que o Map não era completamente inativado pelo processo de pasteurização do leite. Posteriormente, muitos trabalhos confirmaram tais achados, através de estudos realizados com diferentes processos de pasteurização, diferentes amostras de leite (cru ou pasteurizado), contaminadas laboratorialmente com diferentes cepas e doses infectantes do Map (GRANT et al. 1996 ; MEYLAND et al. 1996 ; HOPE et al. 1996 ; STABEL et al. 1997 ; GRANT et al. 1998 ; SUNG & COLLINS, 1998 ; KESWANI & FRANK, 1998).

MEYLAN et al. (1996), nos EUA, evidenciaram a sobrevivência do Map em amostras de colostro, após o processamento de pasteurização experimental. A pasteurização reduziu significativamente a concentração de IgG mas não impediu o seu uso como transferência de imunidade passiva. GRANT et al. (2002b), na Irlanda, avaliaram a incidência do Map em 244 amostras de leite de tanque e 567 amostras de leite bovino comercialmente pasteurizado em 241 estabelecimentos aprovados do Reino Unido. O Map foi isolado em 4 (1,6%) das 217 amostras de leite in natura e de 10 (1,8%), dentre as 534 amostras pasteurizadas. Concluíram que o Map está, ocasionalmente presente em amostras de leite pasteurizado, no Reino Unido.

A outra abordagem foi aquela em que o processo de pasteurização, em escala comercial, fora aplicado às amostras de leite naturalmente contaminadas pelo Map. GRANT et al. (2002a) avaliaram a viabilidade do Map, após o processamento comercial, utilizando a técnica de pasteurização “High Temperature Short Time” (HTST), em amostras de leite, naturalmente infectadas pelo Map. Concluíram que o agente nas amostras de leite naturalmente contaminadas foram capazes de sobreviver ao processo de pasteurização

comercial. Esses dados estimulam o debate e a possibilidade do Map ser ingerido pelo homem, através dos lácteos.

1.7 Resistência a Cloração

O Map é mais resistente ao cloro do que a maioria das outras bactérias. O tempo para redução de 1 log₁₀ de *M. avium* foi de aproximadamente 50 min a uma concentração de 1mg/ml enquanto que o tempo necessário para reduzir a *E. coli* foi de 28 segundos. A susceptibilidade ao cloro variou de acordo com a cepa de *M. avium* testado. As cepas de crescimento mais lento foram as mais resistentes. *M. avium* crescido em água foram 10 vezes mais resistentes ao cloro do que as crescidas em meio de cultura (TAYLOR et al. 2000)

Estudos epidemiológicos desenvolvidos em Los Angeles que evidenciaram que *M. avium* e outras micobactérias, exceto o *M. bovis* e Map, foram isoladas da água que era servida a 82% dos 55 domicílios; em 100% dos 31 edifícios comerciais e de 13 hospitais (ARONSON et al. 1990). Estudos comparativos com o Map ainda não foram realizados, mas supõe-se que o Map é igualmente resistente ao cloro, se não for mais resistente, que o *M. avium* (MANNING & COLLINS, 2001).

1.8 Resistência ao pH

LOVELL et al. (1944), obtiveram a sobrevivência do Map mantidos em água estéril à temperatura de 10° C a 21° C. A viabilidade do microorganismo foi acompanhada mensalmente, registrando-se o pH da água de cada amostra coletada. Testou-se 3 tipos de água: água destilada, água de torneira e água de lagoa. Os valores de pH foram, respectivamente 6,4-6,8; 7,1-8,0 e 5,3- 5,9. O Map foi reisolado nos 3 tipos de água após 8-9 meses da inoculação e, concluem que na faixa testada de pH não pareceu ter ocorrido efeito nocivo sobre a sobrevivência do Map.

2. Ambiente

2.1 Resistência à Luz Ultravioleta (UV)

O Map assim como outros membros da família *Mycobacteriaceae* possuem parede celular rica em lipídios, possuindo notória resistência aos fatores físicos e químicos, explicando, em parte, sua persistência no ambiente. A dose de luz UV capaz de inativar bactérias e vírus é relativamente baixa. Aproximadamente 2 mW.s/cm² a 6mW.s/cm² para inativar 1 log₁₀, (USEPA, 1999 *apud* MANNING & COLLINS, 2001). Entretanto, o poder de desinfecção da luz ultravioleta (UV) pode ser alterado pelas características da água tais como pH, grau de dureza, turbidez e demanda de oxigênio biológico, afetando a desinfecção eficiente através da luz UV (MANNING & COLLINS, 2001). Dados preliminares mostraram que houve uma redução de 1 log₁₀ quando uma concentração de Map foram suspensos em água deionizada estéril e submetidos a uma dose de luz UV igual 4mW.s/cm². Entretanto quando foi aplicada uma radiação de 15mW.s/cm², ela eliminou completamente o organismo (MANNING & COLLINS, 2001). Estudos sobre o efeito da luz natural sobre micobactérias no ambiente indicaram que a radiação UV diminuiu a taxa de sobrevivência e que o Map é mais resistente que o *M. bovis*. Entretanto, um recente trabalho realizado na Austrália mostrou que a luz UV teve um efeito muito pequeno sobre a viabilidade do Map no solo contaminado experimentalmente (SCHROEN et al. 1990 *apud* MANNING & COLLINS, 2001).

2.2 Sobrevivência nas Fezes

LOVELL et al. (1944), obtiveram algumas das melhores informações sobre a sobrevivência do Map no ambiente ao tentar simular as condições ambientais naturais em amostras de fezes expostas às condições ambientais adversas como: ressecamento, congelamento, luminosidade, umidade e temperatura, associadas a regulares colheita de amostras para reisolamento do Map. O agente mantido no ambiente sobreviveu entre 152 a 246 dias, dependendo de condições específicas. Entretanto o solo ressequido pareceu diminuir sua sobrevivência. Os autores concluíram que o Map pode permanecer no pasto por pelo menos um ano após a contaminação e fonte de infecção importante. A colocação de que o Map sobrevive por um ano nas pastagens, freqüentemente encontradas na literatura da paratuberculose bovina tem origem nesses trabalhos visto que poucos trabalhos foram publicados, desde o trabalho de LOVELL et al. (1944). A urina bovina possui um efeito

danoso sobre o agente, especialmente quando estes foram misturados a concentrações que variaram entre de 2% a 10% e pH entre 6,3 a 6,6 (LARSEN et al. 1956).

2.3 Tipo de Solo e pH

Fatores ambientais podem ter um papel fundamental no controle da paratuberculose são o tipo de solo e pH. Na Inglaterra, casos de paratuberculose clínica não eram freqüentes na costa sudoeste, onde os solos eram arenosos e com alta concentração de carbonato de cálcio. Entretanto em outra região, os casos foram associados aos solos ácidos e deficientes em cálcio (SMYTHE 1935, 1951). Observações semelhantes foram confirmadas por JANSEN (1951), na Holanda e França; nos EUA por (KOPECKY, 1973 ; KOPECKY, 1977 ; JOHNSON-IFEARULUNDU & KANEENE, 1997a) e na Espanha por REVIRIEGO et al. (2000). JOHNSON-IFEAREALUNDY & KANEENE (1998), em Michigan, demonstraram após detalhada análise epidemiológica que a aplicação de cal nas pastagens estava associada a uma queda, em dez vezes, na probabilidade dos rebanhos leiteiros tornarem-se sorologicamente reagentes à infecção pelo Map.

3. Epidemiologia

3.1 Morbidade e Mortalidade

A incidência de casos clínicos em um rebanho infectado pelo Map, normalmente é baixa e, raramente atinge 5% dos animais maduros ou adultos. A taxa de mortalidade da população é menor que 1% ao ano e, excepcionalmente pode atingir de 5 a 10%. As perdas econômicas pode ser significantes, considerando o curso crônico da doença, a crônica baixa da produtividade e as mortes (RADOSTITS et al. 2000). A distribuição da paratuberculose bovina é piramidal; para cada caso clínico da doença de Johne em um rebanho leiteiro, haja 2 a 3 animais no estágio da doença clínica; 4 a 8 animais no estágio da doença subclínica ou portadores adultos e 10 a 14 animais com infecção silenciosa nos terneiros, jovens e adultos (WHITLOCK & BUERGELT, 1996).

3.2 Hospedeiros

A paratuberculose está associada a bovinos, ovinos e caprinos, mas outros ruminantes, tanto domésticos quanto silvestres podem ser afetados pela doença ou infecção (MORGAN, 1999).

Há uma grande quantidade de trabalhos, demonstrando que muitas espécies animais podem ser infectadas pelo Map, tanto sob condições naturais quanto experimentais. Diferentes cepas do organismo não são hospedeiro-específicas, mas podem ter alguma preferência pelo hospedeiro, assim cepas ovinas parecem ser principalmente encontradas em ovinos, mas também podem infectar outras espécies. Cepa ovina do Map foi isolada em 3 bovinos em 3 propriedades em que havia contato de ovinos com paratuberculose. Registraram também que ovinos e caprinos criados na mesma área foram infectados pela cepa ovina do Map (WHITTINGTON, 1998 *apud* MORGAN, 1999). Cepas bovinas do Map parecem ter uma distribuição mais ampla na grande maioria das espécies. Map foi isolado de gânglios ileais e mesentéricos de 6 ovelhas que estavam em um sistema de pastejo rotativo que havia sido utilizado, durante 2 anos antes, por bovinos com paratuberculose clínica e de gânglios intestinais e mesentéricos de 5 dos 9 caprinos que havia utilizado a área de pastejo durante mais de 3 anos na qual havia também sido utilizada por bovinos com a doença de Johne (RIS et al. 1987 e RIS et al. 1988 *apud* MORGAN, 1999).

DIERCKINS et al. (1990), na Itália, diagnosticaram paratuberculose em um asno que havia utilizado a mesma área de pastejo utilizado por uma vaca que morreu com a doença de Johne. As lesões histológicas no intestino e nódulos linfáticos mesentéricos assemelharam-se aquelas da paratuberculose e continhas bastonetes A.A.R. Entretanto, não isolaram o agente de tecidos ou fezes.

RIEMANN et al. (1979), na Califórnia, relataram a ocorrência de paratuberculose em veado axis (*Axis axis*) e veado fallow (*Dama dama*) que habitavam em parque nacional compartilhado por fazendas leiteiras. Em levantamento realizado em 5 das 10 propriedades de bovinos leiteiros mostraram que excretavam o Map pelas fezes.

CHIODINI & VAN KRUININGEN (1983), em Connecticut, relatam o isolamento do Map de veado do rabo branco (*Odocoileus virginianus*) que habitavam a propriedade leiteira com história de paratuberculose por mais de 6 anos.

GREIG et al. (1997), na Escócia, examinaram 33 coelhos de 4 propriedades leiteiras separadas entre si em 16 quilômetros. Em 3 das fazendas a paratuberculose tinha sido

diagnosticada no passado. Entretanto a paratuberculose clínica não havia sido relatada na quarta fazenda. Coelhos das 4 propriedades foram encontrados infectados com Map que foi confirmado por isolamento em cultivo e análise por PCR. A percentagem de coelhos positivos por fazenda foi de 87,5%, 50%, 100% e 30%, respectivamente. Em outro estudo epidemiológico, GREIG et al. (1999), mostraram que a probabilidade de achar coelhos infectados pelo Map era maior quando eram de propriedades onde havia história previa de paratuberculose. Houve associação entre o tamanho das propriedades e a taxa de infecção dos coelhos.

Relatos de infecção natural pelo Map em espécies mantidas em zoológicos, incluindo: lhamas (*Lama glama*) por APPLEBY & HEAD (1954); iaque (*Bos grunniens*), búfalos (*Bubalus bubalus*), gnu (*Connochaetes albojubatus*) por KATIC (1961) *apud* WILLIAMS et al. (1979); camelos (*Camelus batrianus*) por THOEN et al. (1977); mouflons (*Ovis musimon*) por BOEVER & PETERS (1974); antílopes saiga (*Saiga tatarica*) por DUKES et al. (1992) ou em criações de animais experimentais, tais como furões por BRYANT et al. (1988); macacos (*Macaca arctoides*) por McCLURE et al. (1987) e mandril por ZWICK et al. (2002).

Relatos da ocorrência de paratuberculose em fazendas de criação de animais como: lhamas (*Lama glama*) por BELKNAP et al. (1992); em suínos por BOLSKE et al. (1999); em alpacas (*Lama pacos*) por RIDGE et al. (1995).

Relatos de paratuberculose em espécies silvestres de criação livre, tais como: caprino das Montanhas Rochosas (*Oreamnos americanus*) por WILLIAMS et al. (1979); veado axis (*Axis axis*) por RIEMANN et al. (1979); veado roe (*Capreolus capreolus*) por HILLERMARK (1966); ovino Bighorn (*Ovis canadensis*) por (WILLIAMS et al., 1979 ; BUERGELT et al. 2000); veado fallow (*Dama dama*) por RIEMANN et al. (1979); bisão americano (*Bison bison*) por CHIODINI & VAN KRUININGEN (1983) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) por (ANGUS, 1990 ; GREIG et al. 1997 ; GREIG et al. 1999); doninhas, raposas (*Vulpes vulpes*) e stoat (*Mustela erminea*) por BEARD et al. (2000).

Em levantamentos epidemiológicos de micobacterioses realizadas em matadouro com o isolamento do Map em equinos, por SMITH (1954) e em suínos obtido por THOEN et al. (1975).

3.2.1 Susceptibilidade de Idade, Raça e Aptidão

Animais jovens com idade inferior a 30 dias são muito mais susceptíveis a infecção orofecal. Esta ideia tem como base os dados obtidos por LARSEN et al. (1975), mas as bases biológicas da idade-dependência são desconhecidas. A susceptibilidade à infecção está provavelmente ligada à maturação da imunidade celular e a capacidade limitada de animais muito jovens com patógenos intracelulares como o Map. Animais adultos podem tornar-se infectados se expostos a grandes e suficientes quantidades de frequência da dose do organismo (PAYNE & RANKIN, 1961ab).

Alguns relatos apontam existir uma susceptibilidade de raça, especialmente as raças britânicas Limousin e Shorthorn de bovinos e ovinos da raça Scottish e Shetland. Entretanto, esses relatos podem refletir a popularidade das raças criadas ou exposições aos fatores (WITHERS, 2000).

Vacas leiteiras de alta produção possuem uma maior probabilidade de desenvolverem a doença clínica se infectadas (DOYLE, 1956 ; DESMECHT, 1975 ; BENEDICTUS et al. 1987).

3.2.2 Resistência Genética

A resistência genética aos patógenos intracelulares, tais como micobactérias (*M. bovis*, BCG e muitas micobactérias atípicas) estão associadas, pelo menos em parte, ao gene denominado “Natural Resistance Associated Protein 1 Macrophage” (NRAMP1) (ABEL et al. 1998 ; GOMES & APPELBERG, 1998). Este gene pode ser importante na fase inicial da infecção pelo Map, embora ainda não tenha sido demonstrado (KOETS et al. 1999 ; MACKINTOSH et al. 2000).

3.3 Distribuição e Difusão

A paratuberculose bovina tem sido reconhecida como de distribuição mundial, desde as primeiras descrições da enfermidade. Ela é uma das doenças infecciosas bacterianas dos animais domésticos que mais se difunde. A enfermidade vem aumentando o número de animais infectados, especialmente no gado leiteiro assim como em outras espécies domésticas tais como: ovinos, caprinos, cervídeos e camelídeos. Entretanto a doença não

ocorre em todas as espécies animais em todas as partes do mundo. Alguns países e algumas regiões possuem uma infecção pequena ou não endêmica. Na maioria dos casos, a sua ocorrência está associada à animais importados e, em alguns países, tem uma importância grande como na Nova Zelândia, Austrália e Reino Unido e países do mediterrâneo como principal causa de doença em ovinos e bovinos (COCITO et al. 1994)

3.4 Infecção

Animais tornam-se infectados pelo Map quando muito jovens. A principal fonte de infecção são as fezes excretadas de animais contaminados. Bovinos infectados podem eliminar, através das fezes, o agente por mais de 18 meses, antes de desenvolverem sinais clínicos da doença de Johne. A dose eliminada diariamente por animais com a forma clínica da doença pode atingir (5×10^5 microorganismos / dia), conforme CHIODINI et al. (1984a).

A infecção ocorre seguindo a ingestão do leite, água e alimento contaminado pelo agente. A contaminação fecal dos tetos, a presença da micobactéria no colostro e no leite pode levar a ingestão de grandes quantidades de microorganismos pelo recém-nascido, através da amamentação. Entretanto, os pastos, as águas e os alimentos contaminados podem ser ainda grandes fontes de infecção (TAYLOR et al. 1981 ; CHIODINI et al. 1984a). Map tem sido isolado do útero, da placenta e de fetos de vacas infectadas por via intra-uterina. O percentual de transmissão intra-uterina em vacas com sinais clínicos da doença é de aproximadamente 37% e 8,6% em vacas sem sinais clínicos (SEITZ et al. 1989; SWEENEY et al. 1992). O microorganismo pode ser cultivado do leite de vacas com sinais clínicos (HUCHZERMEYER et al. 1994 ; RADOSTITS et al. 2000). Embora as alterações patológicas clássicas da enfermidade ainda não tenham sido constatadas nos fetos infectados. O trato reprodutor masculino pode ser contaminado, apesar da transmissão sexual não tem sido comprovada (LARSEN & KOPECKY, 1970). O Map foi isolado do sêmen fresco e do sêmen comercializado congelado (LARSEN & KOPECKY, 1970 ; LARSEN et al. 1981; JORGE et al. 1998). A inoculação experimental intramamária em bovinos causou uma reação limitada e local sem mastite (LARSEN & MILLER, 1978). Tentativas de produção da infecção intra-uterina pela inoculação não obtiveram sucesso (MERKAL et al. 1982). A identificação de lesões tonsilares em bezerros logo após a tentativa de infecção experimental por via oral levaram a sugerir que a tonsila seria o local

primário de infecção com posterior disseminação para outros tecidos por via linfática (PAYNE & RANKIN 1961ab). Entretanto GILMOUR et al (1965) não confirmaram tais observações. No gado leiteiro, onde os animais são individualmente manejados com leite integral ou substituto do leite está associado com rápida disseminação da infecção de um rebanho (SWEENEY, 1996)

3.4.1 Relação Agente-Hospedeiro

A relação agente-hospedeiro pode ser didaticamente classificada em 3 diferentes grupos. O primeiro grupo é denominado infectados resistentes em que os animais desenvolvem resistência rapidamente, controlando a infecção e não sendo eliminadores. O segundo grupo ou de animais intermediários em que a infecção não é completamente controlada. Alguns animais controlam parcialmente a infecção, podendo eliminar o agente intermitentemente; outros incubam a doença tornando-se grandes eliminadores da micobactéria. O terceiro grupo ou dos casos clínicos, os organismos persistem na mucosa intestinal e, neste grupo, surgem os casos clínicos da doença. O organismo é fagocitado por macrófagos que proliferam em grande número; infiltram-se na submucosa intestinal, causando diminuição na absorção de proteínas, diarreias crônicas e resultando na síndrome entérica de má absorção. Nos bovinos, a perda de proteínas resulta frequentemente em hipoproteinemia e edemas. Nos ovinos, há um aumento na produção compensatória de proteínas pelo fígado, mascarando este sinal clínico que só se torna evidente quando falha o mecanismo compensatório (RADOSTITS et al. 2000).

3.5 Importância Econômica

Os custos relacionados com a paratuberculose (doença e/ou infecção) são difíceis de serem quantificados, pois envolvem perdas diretas e indiretas com a enfermidade em determinada região ou país. Além disso, deveriam ser incluídas outras variáveis importantes tais como: o custo social, o custo genético, o custo industrial e o custo em Saúde pública (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001)

A paratuberculose é prevalente nos animais domésticos do mundo inteiro, possuindo impacto significativo na economia global (COCITO et al., 1994 ; SWEENEY, 1996). Ela é considerada uma das mais sérias e custosas doenças que afetam bovinos leiteiros e de corte, especialmente o animais puros (McNAB et al. 1991a ; COLLINS, 1994 ; HUTCHINSON,

1996). Os prejuízos atribuídos à paratuberculose nas diferentes espécies podem ser classificados como: diretos, indiretos e inaparentes. As perdas econômicas variam de acordo com a região, fazenda, e espécie envolvida. Entretanto, algumas vezes, elas poderiam ser tão impactantes que inviabilizariam a atividade pecuária leiteira lucrativa (MERKAL, 1983 *apud* KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

Os custos ditos diretos incluem: a) a doença clínica, b) a doença subclínica, c) o aumento de susceptibilidade às doenças, infertilidade e menor expectativa de vida e d) os custos com o controle da doença. O prejuízo econômico com a forma clínica da paratuberculose em rebanhos leiteiros estão relacionadas: a) as perdas anteriores à eliminação causada pela perda com a produção de leite e custos com exames e tratamentos. b) as perdas com o sacrifício ou morte causado pelo valor reduzido no matadouro e a subutilização do capital aplicado aos equipamentos da fazenda. c) as perdas devido à eliminação prematura ou morte (produção esperada) (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

BUERGELT & DUNCAN (1978), nos EUA e BENEDICTUS et al. (1987), na Holanda, evidenciaram um decréscimo na produção leiteira, variando entre 16% e alcançando 19,6% respectivamente, na última lactação de animais com paratuberculose clínica quando comparados a outros animais do rebanho.

WILSON et al. (1996), no Estado de Nova Iorque, calcularam as diferenças econômicas associadas com a infecção subclínica e produção de leite nas diferentes lactações. Eles sugerem que a forma subclínica da paratuberculose começa a causar prejuízos durante a segunda lactação e estimaram as perdas em 160 dólares na terceira lactação e 300 dólares em lactações superiores. As perdas com a eliminação são de aproximadamente 77 dólares / vaca / ano nos rebanhos infectados. Além disso, a idade do animal infectado é significativamente mais baixa do que animais não infectados, indicando que os bovinos infectados possuem uma expectativa de vida mais curta. Outras perdas associadas com a paratuberculose subclínica estão associadas com alta taxa de mastite, infertilidade e aumento da taxa de eliminação (ABBAS et al. 1983a ; WILSON et al. 1996).

JOHNSON-IFEARULUNDU et al. (1996), em um estudo piloto realizado no Estado de Michigan, evidenciaram aumento significativo no intervalo entre partos de animais subclínicamente infectados e hípidos, entretanto quando o mesmo modelo foi aplicado a 8 rebanhos falharam em mostrar tal efeito.

Os custos com o controle da paratuberculose consistem de custos privados de serviços veterinários; custos dos programas de testes diagnósticos e custos com mudanças com o manejo instituídas pelo fazendeiro especialmente com melhorias na maternidade. Entretanto essas melhorias podem também resultar em controle de outras doenças contribuindo para elevar a saúde e crescimento do bezerro. Os custos indiretos da paratuberculose resultam das restrições ao mercado de acesso; gastos com testes na movimentação de rebanhos tanto na comercialização interna e externa (despesas laboratoriais e veterinárias) e gastos com os fundos para pesquisa. Os custos de aplicação de medidas preventivas e gastos com inseminação artificial são fontes de gastos. Em algumas regiões da Austrália, as restrições de mercado em rebanhos infectados ou suspeitos de paratuberculose oneram, em grande parte, os custos. Animais de fazendas ou áreas conhecidas como infectadas são penalizadas em seus preços ou podem ser comercializadas, exclusivamente para o matadouro. Condições restritivas são geralmente impostas na movimentação para áreas na qual a doença é menos prevalente ou não reconhecida. Tais custos incorrem em vários níveis, desde uma propriedade em particular até propriedades em determinada área onde as restrições de movimentação ou quarentena aumentam os custos comerciais na comercialização interna e externa, segundo (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

Os custos inaparentes incluem a perda do potencial genético, através da eliminação precoce do animal infectado ou através das restrições de mercado. Oportunidade de venda de animais com alto potencial genético em rebanhos infectados estão limitados. A estimativa total da perda econômica causada pela paratuberculose varia consideravelmente, dependendo da produção e sistema de preços. A perda anual estimada pela indústria leiteira com a paratuberculose foi de 5 milhões de dólares na Austrália; de 8,8 milhões de dólares, na Nova Zelândia; de 42,5 milhões de dólares, na Holanda (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001). Nos Estados Unidos, essas perdas foram estimadas em mais de 1,5 bilhões por ano, segundo JONES (1989) *apud* KENNEDY & BENEDICTUS (2001). Entretanto a quantificação exata das perdas sobre a produtividade e lucros ao nível de rebanho individual é muito difícil de avaliar e provavelmente, o seu impacto está subestimado (JOHNSON-IFEARULUNDU et al. 1999a ; OTT et al., 1999). BENEDICTUS et al. (1987), na Holanda, estimaram a perda média / animal com a paratuberculose clínica em 650 libras e, em 510

libras, a perda média / animal com a infecção subclínica. CHIODINI & VAN KRUININGEN (1986), nos EUA, estimaram em mais de 2500 dólares, o custo médio por animal com a forma de doença de Johne. O modelo elaborado pelo Sistema Nacional de Monitoramento em Saúde Animal dos Estados Unidos quantificou a perda econômica entre 40 a 227 dólares por vaca inventariada por ano, tendo por base o percentual de vacas sacrificadas com sinais clínicos de paratuberculose (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001). A perda média com a forma clínica da paratuberculose, segundo JUSTE (1997), na Espanha, foi estimada em 150 dólares e 60 dólares em ovinos leiteiros e de corte por ano, respectivamente. BRETT (1998) *apud* KENNEDY & BENEDICTUS (2001), na Nova Zelândia, estimou as perdas médias anuais variaram entre 20 e 22 dólares por ovelha. Os custos líquidos para o proprietário com a infecção subclínica com Map são estimados em aproximadamente 700 dólares por vaca leiteira infectada. O custo médio com a enfermidade em um rebanho leiteiro é de aproximadamente 100 dólares por vaca, em rebanhos moderadamente infectados, aumentando para 200 dólares por vaca, em rebanhos altamente infectados (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

Atualmente, há evidências contraditórias suficientes para confirmar ou refutar o papel do Map na etiologia da doença de Crohn e, sendo assim a Comissão Europeia sugeriu que urgentemente fossem incrementadas pesquisas esse assunto. Se o Map for colocado na lista de agentes infecciosos transmitidos por alimentos, as conseqüências econômicas para a indústria de alimentos podem ser profundas e de grande alcance, especialmente por não haver estudos sobre o potencial impacto sócio econômico (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

3.6 Levantamentos epidemiológicos

A paratuberculose se difunde muito lentamente, podendo levar anos até que o rebanho seja reconhecido como infectado. A percentagem média de animais infectados é de 38 a 42% por rebanho (LARSEN et al. 1963a ; LARSEN et al. 1963b ; LARSEN et al. 1965; De LISLE et al. 1980). Rebanhos com boas práticas de manejo podem ter uma prevalência de infecção menor, enquanto que outras com pior manejo têm uma taxa de infecção maior. Ocasionalmente, são encontrados rebanhos em que todos os animais estão infectados pelo *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. As perdas anuais com mortes dentro de um rebanho

variam de 3-10% dos animais adultos. O período de incubação pode variar de 6 meses a 15 anos (MACINDOE, 1950). Entretanto a maioria dos casos ocorre entre 3 a 5 anos de idade. A doença em animais jovens é rara, ocorrendo em propriedades com alta taxa de infecção, associada ao manejo deficiente.

Os levantamentos epidemiológicos realizados, especialmente no gado leiteiro possuem uma grande variação em suas estimativas. Essa variação deve-se fundamentalmente a metodologia utilizada (isolamento do agente ou sorologia) e a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados.

Nas décadas entre 1950 e 1980, a prevalência da infecção foi estimada, principalmente pelo isolamento do Map em amostras de tecido obtidas em matadouro.

Na Inglaterra, os 5 estudos pioneiros realizados, entre 1949 e 1954, estimaram uma prevalência média de 10%, variando entre 6% a 17 % (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001).

ABBAS et al. (1983a), na Califórnia, estimaram a prevalência da paratuberculose bovina em 9% em vacas de descarte.

ARNOLDI et al. (1983), em Wisconsin, estimaram a prevalência em 10,8% dentre 991 amostras de válvulas ileocecais trabalhadas.

WHITLOCK et al. (1985), na Pennsylvania, estimaram a prevalência da infecção causada pelo Map no gado leiteiro em 7,2% das 1224 amostras de gânglios linfáticos, ileocecais, íleo e fezes trabalhadas.

CHIODINI & VAN KRUININGEN (1986), em Connecticut, estimaram a prevalência da paratuberculose em 18% das 100 amostras colhidas de vacas leiteiras eliminadas em matadouro.

MERKAL et al. (1987), nos EUA, estimaram a prevalência geral dos EUA em 1,6% das 7.540 amostras, sendo que no gado leiteiro ela foi de 2,9% das 2.827 amostras trabalhadas e no gado de corte foi de 0,8% das 3.522 amostras trabalhadas, utilizando a técnica do isolamento e cultivo do Map em amostras de gânglios linfáticos e ileocecais.

BRAUN et al. (1990), na Flórida, estimaram a prevalência em 8,6% nos bovinos de corte e 17,1% em bovinos leiteiros, utilizando o teste de ELISA.

McNAB et al. (1991a), no Canadá, estimaram a prevalência em 5,5% dentre 400 amostras de gânglios linfáticos, gânglios ileocecais e íleo.

De LISLE & MILLESTONE (1993), na Nova Zelândia, estimaram a prevalência da infecção em rebanhos leiteiros bovinos em 16% em amostras obtidas *post-mortem*.

Recentemente, estudos epidemiológicos sobre a paratuberculose bovina nos animais vêm utilizando o teste de ELISA adsorvido para estimar a prevalência da infecção.

COLLINS et al. (1994), no Wisconsin, relataram que 50% dos rebanhos leiteiros e 7,3% dos animais eram sorologicamente positivos.

BRETT (1998) *apud* KENNEDY & BENEDICTUS, (2001), na Nova Zelândia, estimou a prevalência da infecção em 60% dos rebanhos leiteiros.

ÇETINCAYA et al. (1998), na Inglaterra e Gales, estimaram a prevalência em 17% dos 2.953 rebanhos testados.

WELLS et al. (1999), nos EUA, estimaram em 20% dentre 1000 propriedades leiteiras, distribuídas em 20 estados americanos estavam infectadas pelo Map.

GASTEINER et al. (1999), na Áustria, estimaram a prevalência da infecção em 2% dos animais e 7% dos 2.757 rebanhos leiteiros testados, utilizando o ELISA. Das 87,5% das propriedades positivas somente um animal foi detectado no teste como positivo.

BOELAERT et al. (1999), na Bélgica, estimaram a prevalência da infecção em 32% em bovinos leiteiros; 30% em rebanhos mistos e 7% em rebanhos de corte dos 594 rebanhos testados pelo ELISA comercial.

KALIS et al. (1999a), na Holanda, estimaram a prevalência da infecção em 51% dos 113 rebanhos testados, através do isolamento do Map.

MUSKENS et al. (1999), na Holanda, estimaram a prevalência em 55% dos 378 rebanhos e de $2,5 \pm 3,2\%$ dos animais em cada propriedade positiva, através do ELISA.

NIELSEN & AGGER (2000), na Dinamarca, estimaram a infecção em 55% dos 900 rebanhos examinados. NIELSEN et al. (2000), na Dinamarca, estimaram a prevalência dos rebanhos leiteiros entre 5 a 13 % das 8.071 amostras de leite testadas pelo ELISA.

No Brasil, os trabalhos existentes que procuraram estimar a prevalência da paratuberculose no país são pontuais, trabalhando geralmente um pequeno número de amostras e rebanhos.

RIVERA (1996), no Mato Grosso do Sul, estimou a prevalência em 45,5% das 639 amostras testadas pelo ELISA, em 5 rebanhos de corte com animais com problemas

reprodutivos. Estimou em 65% a prevalência da infecção, dentre 40 animais testados de 4 rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo.

LARANJA DA FONSECA et al. (2000), em São Paulo, utilizando o teste de ELISA comercial americano estimaram a infecção em 37,9% das 403 vacas testadas em 20 rebanhos leiteiros.

FERREIRA et al. (2001) no Rio de Janeiro, estimaram em 18% das 1004 amostras, através do kit comercial de ELISA australiano.

GOMES et al. (2001), no Rio Grande do Sul, isolaram e identificaram o Map em amostras de 8 vacas com a doença de Johne de um plantel importado da Argentina. Estimaram a infecção em 39,8% dos 314 bovinos testados, através do teste de ELISA adsorvido. O teste de IDGA detectou 26 animais positivos (11,4%), dentre as 228 amostras testadas.

4. Patogenia

4.1 Entrada e Localização

Após a ingestão, os microorganismos sofrem endocitose pelas células M da região externa da cúpula que recobre o tecido linfóide organizado do jejuno e íleo, especialmente as placas de Peyer (MOMOTANI et al. 1988). Há evidências de que células epiteliais das vilosidades da região externa da cúpula tornam-se infectadas, entretanto células de outras áreas não são.

As micobactérias íntegras ou degradadas são transportadas em vacúolos, através das células M para macrófagos nas áreas intra e subepiteliais das placas de Peyer e na lâmina própria adjacente (MOMOTANI et al. 1988). Receptores específicos para o Map não foram identificados mas os macrófagos maduros são mais efetivos fagócitos do que os mais novos (ZURBRICK & CZUPRYNSKI, 1987)

Os Map, após a sua penetração estão sujeitos aos processos de degradação e eliminação pelos macrófagos que incluem: formação do fagossoma, fusão do fago-lisossomo, efeito da oxidação respiratória e de intermediários tóxicos do oxigênio. As defesas não oxidativas incluem: proteínas catiônicas, lisozimas, outras enzimas lisossomais e produção de óxido nítrico. Esses fatores permanecem desconhecidos na paratuberculose, embora nos macrófagos de camundongos infectados predomine lisossomo e fagossomo ou fago-lisossomo, contendo 1 ou mais organismos. Os organismos contidos no interior da membrana plasmática dos macrófagos possuem uma zona externa eletro transparente. Essa camada rica em lipídios possui um importante papel na resistência das micobactérias aos mecanismos de destruição intracelulares (GILMOUR et al. 1978 ; TANAKA et al. 1996).

4.2 Imunopatogenia

A literatura relacionada a imunopatogenia da paratuberculose é limitada. A compreensão básica dos eventos imunológicos deriva principalmente dos estudos diagnósticos (CHIODINI et al. 1984a)

A infecção pelo Map se dá normalmente, através da ingestão do alimento contaminado por fezes ou leite crus, contendo o agente. A transmissão intra-uterina é outra possibilidade (SEITZ et al. 1989 ; SWEENEY et al. 1992a). O Map é uma bactéria intracelular obrigatória e, conseqüentemente a imunidade celular é resposta imunológica

primária. A penetração da bactéria no intestino não está ainda totalmente elucidada, mas o mecanismo tem sido sugerido. No íleo, as células M captam a bactéria que são subsequentemente transferidas a macrófagos intraepiteliais e subepiteliais (MOMOTANI et al. 1988). A reação imunológica inicia-se com a fagocitose da micobactéria pelo macrófago. Macrófagos são ativados e uma série de eventos ocorre, muitos deles, não estão totalmente descritos ou entendidos. Entretanto, um ou duas respostas imunológicas ocorrem: Os linfócitos T_H1 da imunidade celular dominam a reação ou os linfócitos T_H2 dominam a reação (MOSMANN & COFFMAN, 1989 ; WATERS, 2001). A resposta do linfócito T_H1 induz imunidade celular com produção de citocinas e, entre elas, interleucina 12 (IL-12) e interferon- γ (IFN- γ). Esta resposta celular é caracterizada pela ativação de macrófagos. A diferenciação dos linfócitos $CD4^+$ em células T_H2 está sendo suprimida, enquanto os linfócitos T_H1 são produzidos. Esta supressão é mediada por citocina específica tal como IFN- γ . Se a supressão elevar-se linfócitos T_H2 poderiam induzir uma resposta humoral.

A resposta humoral é caracterizada pela ativação do linfócito B e produção de imunoglobulinas. A diferenciação em linfócitos T_H2 é mediada pelas citocinas IL-4, IL-6 e IL-10. Essas citocinas suprimem os linfócitos T_H1 . Assim, a resposta geral poderia ser dominada tanto pelo linfócito T_H1 quanto pelo linfócito T_H2 . A ativação do macrófago dependente T_H1 é necessária para uma efetiva eliminação da micobactéria intracelular aconteça uma vez que não está disponível para os anticorpos produzidos durante a resposta dominada pelos T_H2 . As micobactérias também possuem uma capacidade especial de evitar as células $CD8^+$ “Cell T killer”, pois as micobactérias são capazes de esconder-se dentro de macrófagos. Assim a degradação pelas células citotóxicas $CD8^+$ não ocorre necessariamente.

Os dois tipos de reações imunes ocorrem são essenciais no equilíbrio na qual a dominância é determinada por fatores não são bem compreendidos. O equilíbrio poderia inclinar-se tanto para a resposta celular quanto para a resposta humoral. Inicialmente há uma dominância da resposta celular e o sistema imune capaz de controlar a infecção. A imunidade efetiva na infecção intracelular bacteriana freqüentemente requer a lise de células infectadas assim como eliminam patógenos invasores. Não é possível saber se ocorre a eliminação total do Map e, os mecanismos de eliminação estão baseados principalmente em estudos com o *M. tuberculosis* em camundongos (SCHOREY et al.

1997 ; STENGER et al. 1998). Entretanto, durante a resposta imune celular o número de Map é, se não eliminado, mantido a baixos níveis no animal infectado. Há evidências de uma resposta celular pode ser mensurada, através da detecção de linfocinas secretadas de células T_{H1} tais como IFN- γ e IL-1.

As células T_{H1} também ajudam os linfócitos B na produção de IgM, IgA, IgG₂ e uma pequena quantidade de IgG₁. Durante a reação imunológica celular, a resposta humoral com produção de anticorpos está deprimida, mas a infecção segue o seu curso (CHIODINI, 1996). A presença de células T CD8⁺ parece bloquear o sinal de células $\gamma\delta^+$ para atualizar a população de células T_{H2} CD4⁺ que deveriam levar a produção de grandes quantidades de anticorpos (CHIODINI & DAVIS, 1992 ; CHIODINI & DAVIS, 1993). A passagem para as células T_{H2} e domínio da resposta humoral pode ocorrer em um determinado período. A base para essa transição ainda é especulativa mas um mecanismo de dominância tem sido sugerido por CHIODINI & DAVIS, 1992 ; CHIODINI & DAVIS, 1993) em que na infância, os linfócitos T $\gamma\delta^+$ quando essas células T junto com células CD8⁺ são responsáveis pela proliferação de células mononucleares do sangue periférico em resposta aos antígenos do Map (CHIODINI & DAVIS 1992 ; CHIODINI & DAVIS, 1993) Essa dominância na infância poderia explicar a latência da infecção em bezerros.

O desenvolvimento da resposta imune na doença de Johne tem sido descrito, especialmente nas infecções experimentais. A resposta imune na infecção natural em todos os possíveis estágios não foi totalmente descrita, entretanto os estudos experimentais dão idéias sobre a dinâmica dos eventos. A imunidade celular pode ser detectada 1 a 2 meses após a infecção enquanto que a resposta humoral, geralmente acontece de 10 a 17 meses após a infecção (LEPPER et al. 1989b).

Os granulomas tuberculóides são formados nos tecidos infectados, principalmente no íleo, durante a reação imune celular. Esses granulomas são formados principalmente por macrófagos, contendo grande número de micobactérias. Mais tarde, com a dominância do linfócito T_{H2}, os granulomas lepromatosos são vistos. Os granulomas são caracterizados por um grande número de micobactérias dentro de macrófagos (CLARKE, 1997).

A gravidade observada das alterações patológicas é consistente com o grande número de micobactérias, dentro dos macrófagos (BUERGELT et al. 1978). Entretanto,

as vacas podem apresentar a doença clínica, seguindo o desenvolvimento do granuloma tuberculóide (CLARKE, 1997).

Dados sobre a distribuição epidemiológica das mudanças patológicas e sua correlação com os achados clínicos e a resposta imune são esparsos e na maioria deles os casos severos de paratuberculose dominam a literatura. Os eventos que levam a virada dos linfócitos T_H1 para os linfócitos T_H2 são desconhecidos. A dinâmica da mudança no equilíbrio são também desconhecidos assim como é a reversibilidade da resposta do sistema imune, embora seja geralmente aceito que uma vez haja dominância na resposta pelo linfócito T_H2 a reação aparentemente não reverte (WATERS, 2001), pois a imunidade efetiva é induzida somente pelo linfócito T_H1 (CHIODINI, 1996). O tempo dessa troca não é conhecido. Se há um período fixo desde a infecção até a alteração das respostas dos linfócitos T_H1 para o T_H2 não se sabe. Entretanto frequentemente é aceito que a resposta T_H1 pode ser detectada no bezerro por um período bem curto isto é durante poucos meses após a infecção e a resposta T_H2 pode ser detectada na idade adulta com uma probabilidade fixa de diagnóstico não importando a idade do animal está apenas sendo vaca, entretanto atualmente a literatura disponível não sugere um tempo fixo desses eventos (LEPPER et al. 1989b ; McDONALD et al. 1999). O período de incubação fixo na paratuberculose é, muitas vezes, contraditória. Isto é devido à natureza crônica da enfermidade e, possivelmente pela latência na infecção e no período desconhecido da infecção na infância. Assim, a dinâmica da infecção e da doença natural, contendo todos os estágios da infecção ainda não foram totalmente conhecidas para ferramentas diagnósticas sejam aplicadas rotineiramente.

5. Sinais Clínicos e Lesões

5.1 Quadro Clínico

O maior número de casos aparece em indivíduos entre 1,5 e 4 anos de idade, e freqüentemente, coincidindo com o período pós-parto (CHIODINI et al. 1984a) que se manifesta pelo emagrecimento progressivo e em ocasiões por diarreia intermitente que culmina com a morte do animal (CHIODINI et al. 1984a ; SHERMAN, 1985). A paratuberculose bovina subclínica está associada ao aumento dos sinais inespecíficos como diminuição da produção leiteira e transtornos reprodutivos e mais incidência de mastites (MERKAL et al. 1975 ; CORPA et al. 1998).

5.2 Lesões

A patologia da infecção natural pelo Map está descrita em várias espécies, predominando nos ruminantes. BUERGELT et al. (1978), descreveram as lesões macroscópicas e microscópicas da paratuberculose bovina em 32 animais adultos com idades entre 3 a 7 anos e provenientes de 2 rebanhos infectados.

5.2.1 Alterações macroscópicas

Os principais achados macroscópicos foram: enterite crônica, linfangite intestinal crônica e linfadenopatia mesentérica. As lesões foram predominantemente no íleo distal e, geralmente apresentaram término abrupto próximo à válvula íleo-cecal. Lesões no intestino grosso foram observadas em um pequeno número de casos e nenhuma lesão no duodeno, contrariando as lesões observadas em animais experimentalmente inoculados, os quais apresentaram extensas lesões, desde o duodeno até os anus. A mucosa intestinal apresentou-se corrugada e espessada e os linfáticos da subserosa estavam proeminente e dilatados. Atrofia da musculatura esquelética e da gordura foram também observadas. Outras lesões foram observadas em um pequeno número de animais e incluíam: alopecia e calcificação aórtica e endocárdica. O grau das lesões histológicas não foi associado com os sinais clínicos.

5.2.2 Alterações microscópicas

As lesões microscópicas nos casos leves consistiram de células gigante de Langhans dispersas na lâmina própria ou em áreas paracorticais dos gânglios linfáticos; células epitelióides com citoplasma profundamente eosinófilo, bordos celulares distintos; núcleos ovais excêntricos e nucléolo proeminente foram ocasionalmente observados. As lesões consideradas moderadas apresentaram pequeno grupo de macrófagos e células gigantes na lamina própria e submucosa intestinal, nos sinus subcapsulares e na paracortical dos linfonodos e no fígado. Lesões consideradas acentuadas consistiam de um grande número de macrófagos e células gigantes espalhadas pela mucosa, submucosa, túnica muscular e serosa. As vilosidades estavam atrofiadas e as glândulas das criptas distendidas com muitos neutrófilos (polimorfos) e material mucóide. Os vasos linfáticos e gânglios linfáticos apresentavam-se aumentados, inflamados e as vilosidades dilatadas. Ocasionalmente, constatou-se fistulação para a luz (no lúmen) intestinal. As placas de Peyer estão envolvidas por células inflamatórias e não há infiltração. Os gânglios nervosos mioentéricos, ocasionalmente apresentaram-se circundados por leucócitos globulosos, podendo estar associado à resposta alérgica e a diarreia. Os macrófagos pleomórficos ou poligonais com predominância do citoplasma vacuolado, espumoso ou histiocítico estiveram presentes, tanto nas lesões severas ou moderadas. As lesões consideradas moderadas evidenciaram poucos organismos intracelulares quando coradas pelo Ziehl-Neelsen e numerosos organismos nas lesões mais severas. Não há necrose caseosa ou ulceração. As lesões em outras áreas foram menos comuns, confirmando que a região intestinal é o principal lugar da doença. Granulomas microscópicos foram detectados, algumas vezes, no fígado e linfonodos hepáticos. Depleção linfóide do timo foi observada, sugerindo uma causa imunológica ou efeito. Lesões arterioscleróticas no interior do coração e aorta são raras. Entretanto foram detectadas por ALIBASOGLU et al. (1962) e por SIMPSON (1966).

Outros achados, mencionado lesões focais granulomatosas espalhadas, afetando os rins, pulmões, linfonodos sistêmicos foram geralmente observados nos casos mais avançados (HINES et al. 1987). Map têm sido demonstrados no interior de macrófagos sanguíneos e fluidos tissulares de bovinos com a forma clínica da enfermidade, sugerindo a disseminação sistêmica por via linfática e venosa (KOENING et al. 1993 ; VAN DER GIESSEN et al. 1994).

5.2.3 Patologia experimental

A patologia da infecção experimental pelo Map em bovinos é caracterizada principalmente por enterite crônica granulomatosa e linfadenite regional. Os estudos experimentais são dificultados pelo lento desenvolvimento das lesões e por um período de incubação prolongado. Entretanto infecções experimentais via oral em cordeiros e carneiros tem esclarecido a patologia precoce da paratuberculose (CLARKE, 1997). GILMOUR et al. (1965), infectaram experimentalmente carneiros com o Map por via oral e obtiveram lesões granulomatosas focais na região interfolicular das placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, após 3 meses da inoculação. Posteriormente, as lesões se estenderam à mucosa intestinal adjacente, provocando extensas lesões, após 14 meses do experimento. PAYNE & RANKIN (1961ab) detectaram uma única célula gigante na extremidade superior da vilosidade intestinal e nos linfonodos, após 2 meses da inoculação. Observaram agregados de macrófagos, células gigantes e neutrófilos polimorfos no tecido linfóide intestinal, tonsilas e linfonodos suprafaríngeos, após 2-4 meses da inoculação. As lesões intestinais tornam-se mais extensas e difusas com a formação de massas sinciciais de células epitelióides, contendo poucas células gigantes, após 6 meses da infecção experimental. LARSEN et al. (1975), constataram lesões granulomatosas nos intestinos e linfonodos mesentéricos de carneiros e de animais adultos, após 5 meses da infecção. TAYLOR (1953ab) conseguiu demonstrar lesões intestinais e ganglionares transcorridos um período de 16 a 24 meses após a inoculação experimental. PAYNE & RANKIN (1961b) e GILMOUR et al. (1965), não obtiveram sucesso na visualização de lesões macroscópicas em bovinos adultos após 14 meses da inoculação experimental.

6. Diagnóstico

Diferentes técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas, desde que se conhece a paratuberculose como uma enfermidade infecciosa e, até o momento, nenhuma delas é suficientemente eficaz na detecção de todos os animais infectados.

O diagnóstico da doença de Johne deve possuir um enfoque diagnóstico multidisciplinar que pode ser classificada em 4 grupos: aquelas baseadas no reconhecimento de distintas manifestações clínicas e patológicas da enfermidade; as dirigidas a detecção do agente etiológico e as técnicas imunológicas.

6.1 Diagnóstico Clínico e Diferencial

O diagnóstico clínico associado aos dados epidemiológicos pode se fazer suspeitar da existência de paratuberculose em um rebanho. Geralmente é um processo crônico que se apresenta em forma de caso raro.

O diagnóstico laboratorial da paratuberculose é dificultado pelo lento crescimento do *Map* e, pela resposta imune complexa que é montada pelo hospedeiro frente ao agente. O hospedeiro monta uma resposta celular, durante o início da fase subclínica, caracterizada por uma forte reação de hipersensibilidade retardada do tipo IV, com proliferação de linfócitos aos antígenos do agente e, produção de linfocinas estimuladas por linfócitos T sensibilizados. Com a progressão da enfermidade, há uma diminuição da resposta imune celular e, predomínio da resposta humoral. A presença de anticorpos não protege o hospedeiro contra a doença e, no estágio final da doença, há perda de resposta celular específica, permitindo a rápida disseminação da infecção no hospedeiro.

É necessário realizar o diagnóstico diferencial com outros processos crônicos caquetizantes como o estados de desnutrição, tuberculose, deficiência de ferro e cobalto, intoxicação por molibdênio, parasitoses gastrintestinais intensas, enfermidades hepáticas crônicas, abscessos internos (RADOSTITS et al. 2000)

6.2 Detecção do agente

O teste diagnóstico mais utilizado e considerado “*gold standart*” na detecção da infecção é o isolamento e cultivo do agente em amostras de fezes e/ou tecidos. O procedimento requer vários passos no processamento das amostras e de 8 a 16 semanas de incubação. A contaminação de amostras de Map ou meios de cultura pelos microorganismos contaminantes representa um grave problema ao diagnóstico, pois impossibilita a leitura de amostras inoculadas. O processamento de amostras para isolamento e cultivo do Map inclui diversas metodologias bem como o tratamento com inúmeras drogas descontaminantes. Inúmeras técnicas de concentração do Map são utilizadas, especialmente em amostras com pequeno número de microorganismos e, dentre elas, estão a técnica de centrifugação, a sedimentação, a filtração e a separação imunomagnética.

6.2.1 Descontaminação

A contaminação por fungos é um problema importante, especialmente quando trabalhamos com fezes. Há diferentes metodologias utilizadas para isolamento do Map que podem reduzir a contaminação fúngica e bacteriana pelo uso de antimicrobianos (STABEL, 1997). O uso de cultivo fecal como única técnica diagnóstica pode causar interpretação errônea da infecção no rebanho, pois animais subclínicamente infectados podem eliminar intermitentemente organismos infecciosos dos quais, somente 50% são detectados pelo cultivo fecal (SANFTLEBEN, 1990).

A eliminação da contaminação bacteriana e fúngica são essenciais para o isolamento e cultivo do Map. A grande dificuldade consiste em obter descontaminação sem avariar nem inibir o crescimento do agente. Várias substâncias e antimicrobianos têm sido avaliadas na busca de drogas com ação tóxica seletiva sobre microorganismos contaminantes e pouco efeito sobre o Map. A maioria dos meios de cultivo inclui antimicrobianos que inibem microorganismos contaminantes que sobreviveram ao processo de descontaminação. BEERWETH (1967) *apud* NIELSEN et al. (2001) recomendou o uso de ciclohexamida, penicilina, cloranfenicol como descontaminante e a adição de piruvato de sódio ao meio modificado de Löwenstein-Jensen com micobactina. MERKAL & RICHADS (1972) relataram que a anfotericina B era superior a ciclohexamida, nistatina e tetraciclina na prevenção do crescimento fúngico, recomendando a mistura do inóculo com

anfotericina B ou inoculando em meio contendo anfotericina.. Embora não bem estudados parece que quí micos e antimicrobianos utilizados na descontaminação antes do cultivo deve ser confrontado ao método de cultivo. JØRGENSEN (1982), recomendou a descontaminação com hidróxido de sódio e ácido oxálico, seguido do tratamento pelo neomicina e anfotericina B antes da inoculação no meio de Löwenstein-Jensen modificado pela adição de micobactina.

Recentemente, entrou no mercado um suplemento de antimicrobianos denominado PANTA, contendo polimixina B, anfotericina B, ácido nalidí xico, trimetoprima e azlocilina que é recomendado para uso no meio radiométrico BACTEC 12B (NIELSEN et al. 2001).

6.2.2 Concentração

6.2.2.1 Centrifugação

A concentração pela centrifugação de amostras, após a primeira descontaminação, aumenta a recuperação do Map (WHITLOCK & ROSENBERGER 1990 ; WHIPPLE et al. 1991). Há várias combinações de velocidade e tempo de centrifugação descritas na literatura, variando de 900 X G por 30 minutos (WHITLOCK & ROSENBERGER 1990); 1000 X G por 30 minutos (WHITLOCK et al. 1989); 1700 X G por 20 minutos (STABEL, 1997) e 1000 X G e 3000 X G por 15 minutos por (KALIS et al. 1999b). STABEL (1997) relatou que a centrifugação da fração sobrenadante (25-30 mL) como alternativa para aumentar a sensibilidade sem aumento na contaminação. A centrifugação a maiores velocidades pode compactar o “pellet” tornando difícil a ressuspensão e aumentando a taxa de contaminação (WHIPPLE et al. 1991).

6.2.2.2 Sedimentação

As amostras são deixadas sedimentar por um período de 18 horas ou mais, durante ou após a descontaminação, e o sedimento formado no fundo do tubo pode ser inoculado no meio de cultivo.

STABEL (1997) observou que a taxa de contaminação pelo método da centrifugação era mais alta do que pela técnica da sedimentação. O método da centrifugação possuía a mais alta taxa de isolamento do Map quando comparada a técnica de sedimentação, porém mais baixas quando comparadas com o método de pré-incubação implementado e sugerido por STABEL (1997).

6.2.2.3 Filtração

A técnica baseia-se na tendência dos microorganismos em agregarem-se formando aglomerados que são muito maiores que uma célula bacteriana típica ou esporo de fungos. Então os microorganismos podem ficar retidos em membrana de policarbonato com poros de 3 micrômetros de diâmetro, deixando passar a microflora contaminante. A concentração do Map por filtração foi descrita por COLLINS et al. (1990) que utilizou 3 gramas de fezes suspensas em 30 ml de HPC em conjunção com o método de cultivo radiométrico líquido.

6.2.2.4 Esferas imunomagnéticas

A separação imunomagnética é um método rápido e simples para extração de organismos de materiais contaminados e heterogêneos. A técnica está baseada na interação entre os antígenos de superfície e os anticorpos conjugados a pérolas para magnéticas. Colocando a suspensão de pérolas em um campo magnético forte resulta em um complexo de bactérias ao anticorpo aderido a superfície da esfera separadas da suspensão. O complexo separado é ressuspenso em um pequeno volume de líquido resultando na concentração de bactérias e remoção de microorganismos contaminantes. O método tem sido utilizado para extrair Map do leite em que o número de micobactérias é baixo (GRANT et al. 1998)

6.2.3 Tratamento da amostra

As técnicas para cultivo de micobactérias se baseiam na elevada resistência que estas apresentam a ação de determinadas substâncias bactericidas em que são misturadas a amostras com a finalidade de destruir os microorganismos contaminantes. Diversos compostos corrosivos (ácidos e bases fortes) são utilizados, mas com o grande inconveniente de diminuição considerável da viabilidade dos Map (MERKAL et al. 1964). Posteriormente, a partir de trabalhos de Merkal no “National Animal Disease Center” (NADC) se generalizou o uso do cloreto de benzalcônio (MERKAL et al. 1964 ; MERKAL, 1970 ; MERKAL & RICHARDS, 1972 ; MERKAL, 1973 ; LAGADIC et al. 1983) e mais tarde o cloreto de hexadecilpiridí nio que apresenta melhores propriedades descontaminantes e um menor efeito negativo sobre o Map (MOULIN & STOTTMEIER, 1978 ; WHIPPLE & MERKAL, 1983 ; MERKAL, 1984 ; MERKAL et al. 1985). Outros autores obtiveram resultados satisfatórios com o emprego de ácido oxálico ou (BROTHERSTON et al. 1961a ; GUNNARSSON & FODSTAD, 1979 ; SAXEGAARD, 1985) uma combinação de ácido oxálico e hidróxido de sódio (JØRGENSEN, 1982). Recentemente, THORNTON et al. (2002), propuseram uma nova técnica no processamento das amostras para isolamento do Map, utilizando a C₁₈ carboxipropilbetaína (C-18); tratamento descontaminante com um coquetel de enzimas fúngicas tais como: “Lisozima, Zymolyase, *Cytophaga*, *Trichoderma*” (LZCT) e posteriormente a inoculação em diferentes meios de cultivo (BACTEC12B, 7H10, HEYM). A grande vantagem da técnica foi o encurtamento do tempo médio do crescimento colonial.

6.2.4 Cultivo

O cultivo do Map em amostras de tecido é o método mais seguro para a detecção de animais com doença de Johne. O procedimento é muito demorado e vem sendo aperfeiçoado por muitas décadas.

O cultivo do Map pode realizado em sua grande maioria nos meios utilizados para outras micobactérias com a adição de micobactina. Assim, se tem utilizado meios, tendo como base o soro como o de Dubos (GUNNARSON & FODSTAD, 1979), os baseados em gema de ovo como o Herrold (MERKAL et al. 1964 ; MERKAL et al. 1968 ; MERKAL, 1970 ; MERKAL, 1973) ou baseado em ovo inteiro como o meio de Löwenstein-Jensen

(JØRGENSEN, 1982 ; WHIPPLE & MERKAL, 1985) ou os meios totalmente sintéticos como o de Watson-Reid (MERKAL & CURRAN, 1974 ; THOREL & HAAGSMA, 1987) ou as diferentes variantes do Middlebrook (MERKAL & CURRAN, 1974 ; WHIPPLE & MERKAL, 1983 ; THOREL & HAAGSMA, 1987).

6.2.4.1 Cultivo de “Pool”

KALIS et al. (1999c), na Holanda, compararam o “pool” de amostras (5 animais por pool) e amostras individuais, utilizando a técnica de descontaminação de BEERWERTH (1967) *apud* NIELSEN et al. (2001) e o meio modificado por JØRGENSEN (1982). Amostras de bovinos de mesma idade foram reunidas em um “pool”, considerando o cultivo individual como o “gold Standard” da técnica. A da técnica de pool foi 86% e a especificidade foi de 96%. Os autores concluíram que a técnica de cultivo tradicional e a técnica de pool influenciaram substancialmente a sensibilidade diagnóstica e, a amostragem estratégica reduziria os custos dos testes em rebanho não suspeitos.

6.2.4.2 Cultivo Radiométrico

No homem, o isolamento de micobactérias em cultivo, utilizando substratos marcados com radioisótopos iniciou na década de 70 (NIELSEN et al. 2001). O sistema BACTEC, um sistema que inclui o meio de cultivo e equipamento automatizado tornou-se o padrão e a técnica mais comum de diagnóstico da tuberculose bem como em outras micobacterioses humanas. COLLINS et al. (1990) adaptaram e utilizaram o sistema BACTEC 12B para o cultivo do Map, que em sua composição, contém um radioisótopo ligado a uma fonte nutriente ($^{14}\text{CO}_2$ -palmitato). O seu uso ou aplicação encurtou o resultado, quando positivo, em 3 a 4 semanas (McDONALD et al. 1989 ; COLLINS et al. 1990).

WHITTINGTON et al. (1998), na Austrália, incrementaram a utilidade do sistema, combinando o cultivo de amostras no sistema BACTEC 12B e aplicação do PCR IS900 para a identificação rápida do Map, diretamente do meio de cultivo.

O cultivo radiométrico (BACTEC 12B) quando comparado ao meio de cultivo convencional (HEYM), mostrou-se mais sensível e diminuiu o período de incubação quando as amostras foram concentradas por filtração. O cultivo radiométrico é automatizado, mais rápido, mais sensível e mais econômico que a técnica convencional (McDONALD et al.

1989). Entretanto, esta tecnologia exige equipamentos caros e grandes investimentos em segurança biológica, pelo manuseio com substâncias radioativas. Atualmente, há um limitado número de laboratórios que utiliza este sistema no diagnóstico da paratuberculose (NIELSEN et al. 2001).

6.2.4.3 Cultivo não Radiométrico

Há vários sistemas de cultivo do Map automatizados disponíveis que não utilizam radioisótopos. Entretanto, não há muita informação sobre a avaliação desses sistemas no diagnóstico do Map. O sistema incorpora um sistema detector fluorométrico que reage com as alterações na tensão de oxigênio ou dióxido de carbono ou pressão dentro do frasco de cultura. Esses sistemas utilizam uma fórmula especial em frascos selados que são inseridos dentro de instrumentos que ao mesmo tempo incubam e lêem os frascos de cultura, mostrando aqueles com evidência de crescimento, através de luz indicadora. Os dados obtidos pelo sistema de cultivo são automaticamente registrados em computadores acoplados. O técnico pode realizar testes complementares, tais como PCR quando houver crescimento detectado no sistema BACTEC 460 (NIELSEN et al. 2001).

6.2.5 Detecção Molecular

As técnicas baseadas na detecção do ADN bacteriano estão sendo aplicadas às enfermidades que apresentam dificuldades no diagnóstico convencional, especialmente das micobacterioses. As técnicas moleculares, assim como as técnicas de cultivo e isolamento estão em constante processo de avaliação especialmente nos estudos envolvendo a paratuberculose bovina no gado leiteiro.

6.2.5.1 Sondas (IS900 e F57)

O IS900 foi descoberto no final da década de 80 (GREEN et al. 1989; COLLINS et al. 1989) e, aprimorado nos anos posteriores. Há aproximadamente 15 a 20 cópias estáveis dispersas no genoma do Map. O teste de DNA baseado na região 5' do IS900 pode especificamente distinguir o Map de outras micobactérias, incluindo membros do complexo *M. avium* / *M. intracellulare* (MOSS et al. 1991).

A primeira sonda de DNA para o Map em fezes, perdeu especificidade, pois também hibridizava com o *M. avium* (HURLEY et ali. 1989). Posteriormente, outras sondas mais específicas foram desenvolvidas, tendo como base, a seqüência parcial de um elemento de inserção do *M. a. paratuberculosis* denominado IS900 (VARY et ali. 1990). Estudo comparativo entre a sonda de ADN e três diferentes procedimentos no isolamento do agente, demonstrou que 60% dos animais com cultivo positivo podiam ser detectados também pela sonda de DNA (WHIPPLE et ali. 1992). Entretanto, o teste mesmo com especificidade alta foi incapaz de detectar bovinos eliminadores de pequeno número de microorganismos infecciosos.

A outra sonda denominada de F57 (POUPART et ali. 1993) foi preparada em laboratório pela clonagem de segmentos de DNA do Map em vetor de transcrição. Clones recombinantes F57 provaram serem específicos para doença de Johne. Ela falhou no hidridizamento com genomas de todas as micobactérias testadas, incluindo o *M. avium*, reconhecendo todas as cepas de Map isoladas de animais com paratuberculose e do homem com doença de Crohn. Atualmente está sendo utilizada por muitos laboratórios. Uma recente modificação do PCR, incluindo 2 reações de ampliação, utilizando “nested primers” possibilitou, o aumento da sensibilidade do teste, possibilitando detectar cerca de 50 organismos/g de fezes contra 10^4 organismos / g fezes do kit comercial (COLLINS et ali. 1993). Entretanto, o uso de sonda molecular torna-se complicada pela presença de inibidores nas amostras clínicas, comprometendo o sucesso da técnica diagnóstica. A técnica pode ser utilizada na identificação do Map em amostras colhidas, através de esferas imunomagnéticas ou de cepas isoladas em cultivo. Um dos principais problemas relacionados ao uso do PCR como ferramenta diagnóstica é o grande número de reações falso-negativas quando comparadas ao cultivo tradicional e atribuídas ao limite de detecção (10^2 a 10^5), presença de substâncias como uréia, hemoglobina e heparina que inibem as reações enzimáticas e a lise

bacteriana. As reações falso-positivas são causadas essencialmente por 3 principais razões: amplificação de bactérias de bactérias mortas; contaminação de amostras por genes criados no laboratório, durante o teste ou que o IS900 ou segmentos que o “primers” amplificam não são específicos para o Map (NIELSEN et al. 2001).

Futuramente o uso de PCR poderá ter importância, especialmente quando aplicadas às amostras de sangue, na detecção de Map em macrófagos. VAN DER GIESSEN et al. (1992) aplicaram o PCR em amostras de sangue de um rebanho de vacas leiteiras. Dos 72 animais testados, 43 (60%) foram positivos ao teste, enquanto 30% das vacas foram positivas no cultivo. Constataram que o teste sanguíneo foi mais precoce que o cultivo fecal na detecção do agente, sugerindo que o Map estivera presente em monócitos sanguíneo de animais subclínicamente infectados, antes de tornarem-se eliminadores dos microorganismos pelas fezes.

Outras técnicas incluem a detecção do Map, através do PCR aplicada em amostras de tecidos fixadas pelo formal e incluídas em parafina (PLANTE et al. 1996) e o desenvolvimento e aplicação da PCR no sistema ABI 7700 (TaqMan) para detecção e quantificação do Map (KIM et al. 2002).

6.2.6 Bacterioscopia e Histopatologia

Consiste na observação microscópica de bactérias procedentes de esfregaços realizados a partir de fezes e tecidos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Exame microscópico direto pelo ZN é fácil, prático e aplicado às amostras colhidas (mucosa íleo-cecal, gânglios regionais), durante a necropsia. É um método útil na confirmação rápida, especialmente nos casos suspeitos, porém apresenta baixa sensibilidade (MERKAL, 1979), detectando aproximadamente 46% dos casos clinicamente confirmados mediante o cultivo fecal (TAYLOR, 1951 ; JØRGENSEN, 1983). Em bovinos, o seu uso em casos de infecções subclínicas é muito limitado (LARSEN, 1972 ; MERKAL, 1973).

O exame histopatológico é rápido, fácil e barato no diagnóstico da paratuberculose bovina. Biópsias ou amostras de tecidos coradas pela técnica de ZN podem determinar a presença de Map. A visualização de ninhos de bastonetes a.a.r., dentro de macrófagos, especialmente na lâmina própria e submucosa intestinal, geralmente está associado ao diagnóstico positivo. Entretanto, a técnica possui baixa sensibilidade e especificidade,

existindo reações cruzadas com micobactérias ambientais, *Nocardia spp* e bactérias do gênero *Corynebacterium spp*, conforme SHINNICK & GOOD (1994) *apud* BREES et al. 2000.

6.2.7 Imunohistoquímica

Uma alternativa no diagnóstico da paratuberculose foi o desenvolvimento de procedimentos imunohistoquímicos, tendo como base, a presença de antígenos do agente nos tecidos, através do uso de imunoglobulinas espécie-específicas (HINES et al. 1987 ; MASSONE et al. 1990 ; GEISEL et al. 1994 ; THORENSEN et al. 1994 ; COETSIER et al. 1998).

O diagnóstico da paratuberculose, através da imunohistoquímica mostrou ser mais sensível que a coloração A.A.R na visualização do Map (MASSONE et al. 1990). Entretanto este procedimento não é específico não diferenciando as espécies do gênero *Mycobacterium spp*, especialmente o *M. bovis* (STABEL et al. 1996 ; COETSIER et al. 1998). O soro de bovinos, caprinos e coelhos infectados foram utilizados na detecção de antígenos do Map em seções de tecido incluídas em parafina e fixadas em formol (GEISEL et al. 1994). COETSIER et al. (1998) prepararam e testaram um anticorpo monoclonal e policlonal, utilizando o polipeptídeo recombinante (a362) espécie-específico para células B no diagnóstico imunohistoquímico da paratuberculose em ruminantes. A técnica foi capaz de identificar antígenos nos tecidos e gânglios linfáticos de bovinos, tanto com as formas pluribacilares ou paucibacilares. Além disso, os antígenos não reagiram com tecidos de bovinos infectados pelo *M. bovis*.

A detecção de antígenos do Map pela imunohistoquímica poderão levar ao desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas (BREES et al. 2000).

6.2.8 Detecção Química

O sistema de detecção do Map baseado na análise de componentes químicos únicos a bactéria está disponível, existindo ainda potencial para a detecção, através do HPLC, de componentes da parede celular, especialmente os ácidos micólicos que poderão identificar a presença do Map em amostras clínicas, além do uso de coloração álcool-ácido-resistente (A.A.R.) ou coloração de Ziehl-Neelsen (NIELSEN et al. 2001)

6.2.9 Outras Técnicas

Outras técnicas como imunofluorescência (ABBAS et al. 1983b ; WOODS et al. 1995) e imunoperoxidase (NGUYEN & BUERGELT, 1983 ; STABEL et al. 1996) têm sido desenvolvidas para diagnóstico da paratuberculose, porém apresentam baixa especificidade.

6.3 Diagnóstico Imunológico

A natureza espectral da resposta imune é uma característica comum das enfermidades produzidas pelas micobactérias (CHIODINI et al. 1984a). As provas baseadas na detecção da resposta humoral frequentemente mostram resultados negativos nas fases iniciais da infecção, porém são positivas nas fases finais da doença quando a carga antigênica é considerável. O contrário ocorre quando os testes de imunidade celular produzem resultados negativos nos estágios mais avançados ou no estado de anergia da doença, parecendo improvável que o diagnóstico da paratuberculose por meios indiretos possa basear-se na detecção de um único tipo de resposta imune.

O Map possui mais de 40 componentes antigênicos conhecidos muitos dos quais são comuns a outras subespécies do *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium bovis* (GUNNARSSON & FODSTAD, 1979). Os grupos antigênicos do Map incluem o complexo antigênico termo-estável macromolecular A36 ou “thermostable macromolecular antigen” (TMA) A36 e numerosos glicolipídios. O TMA A36 contém proteínas antigênicas como a P34 que é bem reconhecida pelo anticorpo no soro de animais infectados e pouco reconhecida pelos lipídios e glicanos antigênicos (De KESEL et al. 1993). Antígenos glicolipídios tais como glicopeptidolipídio 1 e LAM que são relativamente imunogênicos

nas micobactérias têm sido identificados no Map e, sendo capazes de provocar uma resposta com produção de anticorpos (SIBLEY et al. 1988).

6.3.1 Resposta Celular

Há diferentes técnicas que podem ser aplicadas na avaliação da resposta celular, entre elas, estão incluídas: o teste intradérmico (KÖRMENDY, 1988), o teste de transformação do linfócito (BUERGELT et al. 1977), o teste de inibição da migração (BENDIXEN, 1977ab) e o teste de produção de gama interferon (WOOD et al. 1989 ; ROTHEL et al. 1990).

6.3.1.1 Teste Intradérmico

O teste intradérmico tem sido a prova da imunidade celular amplamente utilizada no diagnóstico da paratuberculose em bovinos apesar de sua baixa sensibilidade e especificidade (LARSEN et al. 1965 ; LARSEN, 1972 ; THOEN & MUSCOPLAT, 1979 ; De LISLE et al. 1980a). Os animais infectados com o Map evidenciam uma resposta imune do tipo celular ao contato com determinados produtos micobacterianas como os derivados proteicos purificados ou “purified protein derivative” (PPD), tais como a jonina e a tuberculina aviária obtidas do cultivo do Map e do *M. avium*, respectivamente (JOHNSON 1944 ; SIGURDSSON, 1956). O teste de hipersensibilidade retardada, teste alérgico cutâneo ou também denominado teste “*delayed-type hypersensitivity*” (DTH) é uma prova diagnóstica fundamental no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. Esse mesmo teste cutâneo foi utilizado no diagnóstico da paratuberculose. O teste é considerado positivo quando há um aumento na espessura da pele maior que 3 mm, no local da inoculação, após 24 a 72 horas (NIELSEN et al. 2001).

CHIODINI et al. (1984a), COCITO et al. (1994) e COLLINS, (1996) não recomendam o teste cutâneo no diagnóstico alérgico da paratuberculose bovina, pois ele possui baixa sensibilidade e pequena correlação entre o estagio de infecção do animal.

6.3.1.2 Inibição da Migração Linfocitária

A prova da inibição da migração linfocitária valoriza a dispersão de um concentrado de leucócitos quando incubados com antígeno específico (jonina) Os que não são sensibilizados tendem a se dispersar pela superfície de agarose e os que são sensibilizados tendem a ficar fixados (BENDIXEN 1977a). A prova baseia-se na produção “*in vitro*” de um fator inibitório da migração leucocitária pelas células sensibilizadas, impedindo o movimento dos leucócitos. A técnica foi pouco utilizada e não fora capaz de detectar os animais na fase pré-clínica (BENDIXEN, 1977b).

6.3.1.3 Transformação Linfocitária

A prova de transformação linfocitária consiste na demonstração do efeito de transformação linfoblástica ou de regressão a um estado de grande atividade nuclear dos linfócitos sensibilizados frente ao antígeno micobacteriano (BUERGELT et al. 1977 ; MILNER et al. 1981) Esta técnica requer períodos de incubação de 3 a 7 dias assim como o uso de radioisótopos (WOOD et al. 1989). Os testes de inibição da migração linfocitária e o da transformação linfocitária contam com o inconveniente de necessitar para sua realização linfócitos vivos, além de apresentar uma considerável complexidade técnica sem oferecer resultados compensadores (MERKAL 1973 ; JUSTE & ADURIZ, 1990)

6.3.1.4 Interferon gama (INF γ)

Nesses últimos anos, foram desenvolvidas 2 técnicas capazes de detectar interferon gama em bovinos. Uma denominada de bioensaio (WOOD et al. 1989) e outra denominada de ELISA sanduíche (ROTHEL et al. 1990). Esta técnica celular “*in vitro*” está baseada na detecção de uma citocina solúvel no plasma, o interferon gama, que é liberado de linfócitos T sensibilizados como resposta a um antígeno específico (WOOD et al. 1989). Ela foi desenvolvida, pela primeira vez, na espécie humana e, posteriormente aplicada ao diagnóstico da tuberculose bovina (WOOD et al. 1990). O anticorpo monoclonal que se utiliza também reconhece o interferon gama de ovelhas, cabras e búfalos, porém não o de suínos, cervos e do homem (ROTHEL et al. 1990). Existem estudos que o apontam que é significativamente mais sensível que a tuberculina e que o ELISA no diagnóstico da tuberculose bovina (RITACCO et al. 1991 ; WOOD et al. 1991 ; DOMINGO et al. 1995).

A prova do interferon γ foi modificada para a detecção da infecção pelo Map pela incubação de sangue completo e a PPD aviária (WOOD et al. 1989). A prova foi aplicada em um rebanho bovino com histórico da doença de Johne que detectou animais infectados em todas as fases da enfermidade e com uma sensibilidade semelhante entre vacas com a enfermidade subclínica ou clínica (BILLMAN-JACOBÉ et al. 1992). WOOD et al. (1992) relataram que a resposta pelo teste de interferon gama variara consideravelmente ao longo da infecção. Assim, na fase pré-clínica, a prova seria positiva antes mesmo dos animais eliminarem micobactérias pelas fezes. Posteriormente com o avanço da enfermidade o nível de interferon γ declinara em alguns animais, resultando em negativos a esta prova. Esses dados foram posteriormente confirmados, ressaltando a utilidade do teste de interferon gama na identificação de animais com infecção subclínica (STABEL et al. 1996 ; SWEENEY et al. 1998).

6.3.2 Resposta Humoral

As provas baseadas na detecção da resposta humoral tem sido as mais amplamente utilizadas para o diagnóstico da paratuberculose devido principalmente ao seu baixo custo, facilidade de obtenção e envio e, algumas vezes, o processamento automático de amostras (JUSTE & ADURIZ, 1990). Existem diversas técnicas sorológicas descritas e que vem sendo aperfeiçoadas, durante décadas; entre elas estão a fixação do complemento (FC), imunodifusão em gel de agar (IDGA), teste imunoenzimático (ELISA) e outras técnicas menos utilizadas como: a imunofluorescência (IF), a imunoperoxidase (IP) e a eletroforese (EF).

6.3.2.1 Fixação do Complemento

O teste de fixação do complemento, utilizando antígenos não purificados foram utilizados no passado. A fixação do complemento era a técnica sorológica tradicionalmente empregada no diagnóstico da paratuberculose (PEPIN et al. 1987 ; NORRIS & SPENCER, 1990) apesar de sua baixa sensibilidade e especificidade. Neste sentido tem sido descritas reações cruzadas com outras espécies bacterianas como o *Corynebacterium renale* em bovinos (GILMOUR & GOUDSWAARD, 1972 ; YOKOMIZO et al. 1985), *Rhodococcus equi* (McKENZIE et al. 1981) *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos (PEPIN et

al. 1987) e outras micobactérias (TAYLOR, 1951a ; WILKS et al. 1981 ; ABBAS et al. 1983b). Apesar do teste ter utilizado antígenos preparados de cultivos de *M. avium* (RATNAMOHAN et al. 1986) ou do Map (ABBAS et al. 1983b) e polissacarídeos não purificado (De LISLE et al. 1980a ; De LISLE et al. 1980b ; BROOKS et al. 1988 ; SUGDEN et al. 1988) nenhum deles proporcionou um rendimento aceitável na detecção de animais com infecções subclínicas (GOUDSWAARD et al. 1976 ; De LISLE et al. 1980ab ; WILLIAMS et al. 1985 ; SHERMAN et al. 1990). O FC apesar de sua baixa especificidade e sensibilidade é ainda o teste de referência na exportação de gado bovino (COLGROVE et al. 1989).

6.3.2.2 Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)

Esta técnica esta baseada na visualização da precipitação do complexo antígeno-anticorpo que tem lugar em uma placa de gel de agar. A imunodifusão em gel de agar é uma técnica rápida que se aplica inicialmente ao diagnóstico da paratuberculose de bovinos mas que foi desaconselhado posteriormente por sua escassa sensibilidade e especificidade (RIEMANN & ABBAS, 1983 ; CHIODINI et al. 1984a). Em bovinos, SHERMAN et al. (1984) e SHERMAN et al. (1990) obtiveram uma sensibilidade de 96,9% no diagnóstico de casos clínicos confirmada pelo cultivo ou pela necropsia. COLGROVE et al. 1989 encontraram uma sensibilidade de 54,5% em animais com a sintomatologia clinica. Esta percentual diminui de 33% até 18,9% se somente se estudamos animais infectados com a forma subclínica (SHERMAN et al. 1989 ; SHERMAN et al. 1990). Representando um terço da sensibilidade do cultivo de fezes (SHERMAN et al. 1989). Entretanto esta técnica representa uma elevada especificidade, superior a técnica de FC quando se avaliam animais não infectados ou infectados subclínicamente (SHERMAN et al. 1984; SHERMAN et al. 1990). Nos ovinos, o IDGA possui sensibilidade e especificidade maiores que nos bovinos. JUSTE et al. (1988), obtiveram uma sensibilidade de 100% em animais clinicamente suspeitos ou com confirmação bacteriológica e histológica. A IDGA parece possuir valores baixos de sensibilidade mesmo em animais eliminadores (SOCKETT et al. 1992b).

O teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) tem comportamento semelhante ao Teste de FC. O teste comercial (Rapid Johne's Test , Immucell Corp. Portland Maine) é um produto do citoplasma celular da cepa 18, recentemente identificada como *M. avium*

sorotipo 2 (CHIODINI, 1993). O IDGA é essencialmente utilizado para confirmar o diagnóstico de paratuberculose em animal com suspeita clínica da doença visto que este teste torna-se positivo em animais no estágio avançado da doença (SHERMAN & GEZON, 1980 ; SHERMAN et al. 1984 ; SHERMAN et al. 1989 ; SHERMAN et al. 1990).

6.3.2.3 Imunoenzimático (ELISA)

O ELISA foi aplicado pela primeira vez no diagnóstico da paratuberculose por JØRGENSEN & JENSEN (1978) com resultados satisfatórios e aplicada a animais infectados experimentalmente. A técnica mais empregada é o ELISA indireto que consiste em fazer reagir as amostras de soro com um antígeno fixado as paredes de poço de plástico. As imunoglobulinas micobacterianas são capturadas pelo antígeno selecionado e o complexo antígeno-anticorpo é revelado por um segundo anticorpo ligado a uma enzima que catalisa a reação que é medida pelo espectrofotômetro.

MILNER et al. (1989) citam como vantagens a rapidez e o menor custo em relação ao cultivo, destacando o número baixo de falsos positivos. Posteriormente, foi introduzida na técnica de ELISA uma etapa denominada de pre-adsorção de amostras em que havia adição de uma suspensão de *M. phlei* para remover ou bloquear alguns anticorpos responsáveis por reações cruzadas e pelos resultados falso-positivos (YOKOMIZO et al. 1983ab ; YOKOMIZO et al. 1985 ; MILNER et al. 1990;). Dois testes comerciais estão disponíveis comercialmente (Allied Monitor Inc. Fayette, Mo) e o CSL-ELISA (Johnes absorbed EIA, Commonwealth Serum Laboratories Melbourne Austrália). O último ensaio está baseado no antígeno parcialmente purificado da cepa 18, enquanto o último, utiliza o antígeno citoplasmático total da cepa VRI 316. Recentemente, um ELISA baseado no polissacarídeo lipoarabinomanano (LAM) tem sido submetido ao teste de campo. Este teste mostrou perda de especificidade devido as reações cruzadas com corinebactérias e outras micobactérias (McNAB et al. 1991 ; McNAB et al. 1991).

O “dot” ELISA utiliza antígenos citoplasmáticos totais ou antígenos parcialmente purificados do Map cepa ATCC 19698 como reagente e produzindo resultados qualitativos (infectado ou não infectado) (WOODRUFF et al. 1991).

O grau de sensibilidade do FC, AGIDT, Allied-ELISA, CSL-ELISA na detecção da infecção subclínica (estágio I e II) foram estimados em 38,4%; 26,6%; 58,8% e 43,4%

respectivamente. Somente no estágio I foram estimadas em 14,5%; 4,3%; 47,8% e 24,6%, respectivamente. Somente no estágio II foram estimadas em 54,6%; 40,7%; 65,7% e 56,5%, respectivamente. Os valores estimados quanto a especificidade foram de 99%; 100%; 95% e 99%, respectivamente (SOCKETT et al. 1992).

Um ELISA baseado no antígeno A36 detectou corretamente bovinos infectados, em todos os estágios da doença (De KESEL et al. 1992 ; De KESEL et al. 1993). Após a identificação de epítomos da célula B espécie-específicos da proteína de 34 kDa (P34) componente do A36 da porção carboxiterminal desta proteína (a 362) que contém somente epítomos espécie-específicos foi utilizado como antígeno no ELISA (De KESEL et al. 1993). O teste de ELISA, utilizando o antígeno a362 foi negativo com animais tuberculosos e positivos com bovinos com paratuberculose (De KESEL et al. 1993 ; VANNUFFEL et al. 1994).

7. Controle

A paratuberculose possui difícil e longo controle, especialmente pelo: seu longo período de incubação, ausência de sinais clínicos nos estágios iniciais da doença, durante o qual os animais podem ser disseminadores do agente pelas fezes, mas sem apresentar sinais clínicos (COLLINS & MORGAN, 1991). A conhecimento da patogenia e epidemiologia da infecção não são suficientes na detecção dos fatores de risco como pontos no controle. Considerações econômicas, éticas, legais, acompanhadas pelo “marketing” de animais como infectados ou expostos à doença são fundamentais para o controle. A implantação de medidas de controle ainda está relacionada e dependente dos recursos individuais das propriedades tais como manejo, força de trabalho, recursos financeiros e de outras facilidades (ROSSITER & BURHANS, 1996).

A inexistência de uma prova diagnóstica eficiente e eficaz dificulta enormemente o controle da paratuberculose bovina e faz com que a sua erradicação seja um objetivo muito distante. Os animais infectados de um rebanho podem ser identificados mediante a aplicação de provas bacteriológicas, sorológicas ou da imunidade celular. Entretanto as provas baseadas na resposta imune proporcionam um elevado número de falsos positivos com que os programas de controle estão baseados. O primeiro passo a ser considerado no controle da paratuberculose é a seleção de testes apropriados.

Atualmente, o teste de ELISA (COLLINS et al. 1991 ; SOCKETT et al. 1992 ; COLLINS & SOCKETT, 1993) e o cultivo fecal (COLLINS et al. 1990 ; WHITLOCK et al. 1990 ; WHIPPLE & ROSENBERGER, 1991 ; SOCKETT et al. 1992) estão disponíveis, sendo os mais comumente utilizados, já que os outros testes possuem limitações que os excluem como testes de rebanhos. A sensibilidade dos dois testes está em torno de 40% e 50% e um único teste aplicado ao rebanho identifica a metade dos infectados. O ELISA quantifica indiretamente a resposta imune à infecção, é rápido e barato. O cultivo fecal identifica o Map diretamente nas fezes, é mais demorado e mais caro. Os dois testes estão bem indicados na detecção de animais nos estágios mais avançados da infecção, falhando ambos na detecção de animais na infecção inicial subclínica e de animais muito jovens. A especificidade desses dois testes está em torno de 99% e 100%, respectivamente para o ELISA e o cultivo fecal, carregando um alto grau de confiança (ROSSITER & BURHANS, 1996).

7.1 Tratamento

Estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” tem sido realizados nestes últimos 30 anos para avaliar a eficácia de diferentes drogas administradas sozinhas ou combinadas para controle da infecção causada pelo Map ou doença de Johne, nos ruminantes (CHIODINI, 1989 ; BELLOLI et al. 2001).

O tratamento farmacológico e sua utilização na paratuberculose não se justificam mesmo que pequenas melhoras possam ser obtidas com o uso de drogas como hidrazida ou estreptomicina (LARSEN et al. 1950 ; ANGER, 1956). Ela geralmente é antieconômica, possuindo um custo que, muitas vezes, supera o valor dos animais. Além disso, na maioria dos casos, as melhoras obtidas desaparecem quando cessa o tratamento (LARSEN et al. 1950). O emprego de anti-inflamatórios e imunossupressores, buscando uma diminuição da intensidade da resposta do hospedeiro parece possuir pouco efeito benéficos (FOLLETT & CZUPRYNSKI, 1990).

A eficácia do tratamento de terneiros infectados pelo Map, utilizando rifampicina, pirazinamida e estreptomicina avaliada. A ação intracelular da rifampicina e da pirazinamida associada à ação extracelular da rifampicina e da estreptomicina resultou num efeito sinérgico (BELLOLI et al. 1994). Entretanto, esses fármacos não mostraram ação

bloqueadora na eliminação da micobactéria pelas fezes em animais com infecção natural (MERKAL & LARSEN, 1973 ; WHITLOCK & DIVERS, 1983). A terapia com antimicrobianos pode reduzir os sinais clínicos da paratuberculose, mas não elimina a infecção (MERKAL et al. 1973 ; WHITLOCK & DIVERS, 1983 ; BELLOLI et al. 2001).

7.2 Vacinação

A vacinação contra a doença de Johne foi descrita na França, pela primeira vez, por VALLEE & RINGJARD (1926) *apud* CHIODINI (1996), em que a inoculação subcutânea de cepas vivas e não atenuadas do Map não resultaram em infecção. Desde então, diversas composições foram utilizadas tais como: vacinas atenuadas ou bacterinas (HAGAN, 1935 ; DOYLE, 1945 ; LARSEN, 1950 ; STUART, 1965 ; GILMOUR & BROTHERSTON, 1966 ; LARSEN et al. 1974); mortas pelo calor (BROTHERSTON et al. 1961 ; HUITEMA, 1967 ; LARSEN et al. 1978) e de cepas rompidas a fragmentos.

As vacinas que provocam hipersensibilidade e imunização são aquelas que utilizam o metanol como agente de extração, tanto de organismos mortos, vivos ou seus resíduos, enquanto que os resíduos extraídos pelo álcool e frações protoplasmáticas causam pouco ou nenhuma hipersensibilidade e não funcionam como vacinas efetivas. A vacinação geralmente reduz o número de animais com a forma clínica da doença, diminuindo o número de animais eliminadores da micobactéria pelas fezes e reduz o número de animais com infecções intestinais detectáveis (LARSEN et ali. 1978; STUART, 1965). A vacina pode proteger o animal da doença clínica ou apenas retardar o seu aparecimento. Esse atraso no aparecimento da doença pode ser vantajoso, pois posterga a enfermidade para além do período produtivo. Os animais vacinados não devem e não podem ser considerados como livres da paratuberculose, sendo que as medidas de manejo e controle necessárias para obtenção de benefícios máximos (LARSEN et ali. 1978 ; SUMMERS, 1981).

A desvantagem da vacinação é o desenvolvimento no local de inoculação de um processo inflamatório e desenvolvimento de nódulo fibro-caseoso (com 32 a 42mm de diâmetro) (LARSEN & GROTH, 1949 ; LARSEN et ali. 1974 ; SUMMERS, 1981). Esses nódulos podem tornar-se excessivamente grandes (250 X 127mm), especialmente na revacinação (DOYLE, 1945).

A vacinação com cepas viva provoca a recuperação de microorganismos viáveis no nódulo de inoculação, mesmo após 6 anos pós-inoculação (LARSEN et ali., 1969). Após a imunização há o desenvolvimento de uma forte e persistente sensibilidade a tuberculina aviária e mamífera (DOYLE, 1945 ; HUITEMA, 1967 ; LARSEN, 1973 ; LARSEN et ali., 1969 ; LARSEN et ali., 1974 ; SPEARS, 1959). A vacinação com cepas vivas do Map tem sido utilizadas na Europa (DOYLE, 1964 ; SPEARS, 1959 ; STUART, 1965), enquanto que nos EUA, ela é fundamentalmente uma bacterina preparada com a cepa 18 (conhecida agora como *M. avium*) morta pelo calor e suspensa em óleo mineral. Embora ambas sejam capazes de estimular a imunidade celular e humoral, elas não são capazes de produzir níveis apreciáveis de proteção (CHIODINI et ali., 1984a).

As vacinas contra a paratuberculose aumentaram sua sensibilidade à tuberculina em cerca de 8 vezes, a de bovinos normais. Essa sensibilização cruzada interfere com os programas de erradicação à tuberculose. Animais tuberculosos podem ser diferenciados dos vacinados, pelo teste intradérmico comparativo (SPEARS, 1959).

7.3 Programas de Controle

Existe, segundo COLLINS (1998) pontos críticos para o controle da paratuberculose bovina. 1) Rebanhos não infectados em que os animais devem ficar como estão e as medidas de prevenção pagam. O Map é sempre introduzido pela compra de animais ou por animais portadores. A compra de animais, nesses casos, deveria ser de rebanhos certificados. Recomenda-se o programa de biosegurança na pré-compra em que testa-se 40 vacas com mais de 4 anos pelo ELISA. Se todas forem negativas, a probabilidade dos outros animais comprados apresentarem resultados negativos é maior que 95%.

2) Rebanhos infectados em que se deve utilizar o princípio de Teste e eliminação de vacas. Os animais neste grupo são anualmente testados e eliminados os portadores subclínicos.

3) Eliminação da descendência de vacas positivas em que há probabilidade de transmissão da mãe infectada para o seu produto, através do leite e colostro infectados ou pela infecção intra-uterina.

4) Evitar ou eliminar a transmissão pelo manejo reprodutivo. Touros são responsáveis pela introdução da paratuberculose em rebanhos. Não está bem claro se há

transmissão do Map pelo sêmen ou se há somente contaminação fecal do ambiente. O uso da inseminação artificial está indicado como alternativa de controle. Nas vacas de grande valor genético está indicada a transferência de embriões como técnica segura contra a infecção do produto de mãe infectada.

5) Corrigir o manejo ambiental com a colocação de cercas em cursos d' água que drenam pastos contaminados e limpeza de tanques e bebedouros d' água. Concentração de animais em lugares úmidos e lamacentos, especialmente na época de parição. Se os animais são separados e mantidos em maternidade, o pasto, as baias e as vacas devem ser mantidas limpas e secas. Mãe e filho devem ser removidos da maternidade tão logo seja possível para evitar o risco ambiental. O feno para alimentação no inverno deve ser colocado em diferentes locais, prevenindo o acúmulo de fezes contaminadas em uma determinada área.

6) Manejo do terneiro em rebanhos leiteiros deve contemplar a alimentação artificial, pois é uma das mais eficazes medidas de controle da enfermidade. Esta técnica pode ser aplicada especialmente em pequenas propriedades em que os terneiros de vacas especiais são resgatados pela alimentação individual com colostro seguro ou com substituto do leite. Embora, esta técnica esteja fora de questão para a maioria dos criadores de vaca e terneiras (COLLINS, 1998).

A eliminação da doença no rebanho eficiente poderia ser obtida pela eliminação de todos os animais e manutenção da área livre de ruminantes, durante mais de dois anos, repondo uma nova população, comprovadamente livre do agente (RADOSTITS et al. 1994 ; HUCHZERMEYER et al. 2000).

ROSSITER & BURHANS (1996) consideram ainda como ponto importante na estratégia de controle da paratuberculose, o uso de vacinas associadas às mudanças de manejo e / ou testes diagnósticos.

8. Importância em Saúde Pública

A literatura disponível é contraditória sobre o papel do *Mycobacterium paratuberculosis* como agente etiológico da Doença de Crohn (DC), uma íleo-colite granulomatosa crônica do homem, sugerindo que o *M. paratuberculosis* esteja incriminado como etiologia e foi isolado em alguns casos (CHIODINI & ROSSITER, 1996).

Em 1901, Thomas K. Dalziel, um cirurgião escocês, trabalhando em Glasgow, Escócia, operou um colega com inflamação crônica do intestino. Ele estava familiarizado com a recente descrição de doença de John e, da pesquisa pelo agente bacteriano envolvido. Ele reuniu outros casos, e publicou suas observações com o nome de “Enterite Intersticial Crônica, no *Jornal Médico Britânico*, em 1913. Ele escreveu que o aspecto histológico da doença era tão semelhantes à Doença de John “*que justificaria a proposição que a doença poderia ser a mesma*”. O dilema de Dalziel fora que não foi possível a visualização de micobactérias álcool-ácido resistentes (A.A.R.) no intestino de pacientes com a doença (HERMON-TAYLOR et al. 1998). Desde lá, frequentemente o Map têm sido relacionado com a Doença de Crohn (DC), tendo como base, as semelhanças entre essas duas enfermidades e, alguns pesquisadores consideram a paratuberculose como zoonose (CHIODINI et al. 1984b ; HERMON-TAYLOR et al. 1990 ; HERMON-TAYLOR et al. 1994 ; CHIODINI & ROSSITER, 1996 ; HERMON-TAYLOR, 2000 ; HERMON-TAYLOR et al. 2000). Os alimentos como leite e, possivelmente a carne podem tornarem-se fontes de infecção e, desse modo, a doença tem despertado atenção sob o ponto de vista de segurança alimentar (SWEENEY et al. 1992b ; STABEL et al. 1997 ; COLLINS, 1997 ; GRANT et al. 1998 ; KESWANI & FRANK, 1998).

A literatura sobre o envolvimento do Map na etiologia da DC é abundante e contraditória. O uso de sondas genéticas e PCR, aplicadas a vários estudos tem indicado a presença de micobactérias e, entre elas, a presença do Map (McFADDEN et al. (1987) ; SANDERSON et al. (1992) ; McFADDEN et al. (1992) ; LISBY et al. 1994 ; SUENAGA et al. (1995) ; FRANCOIS et al. 1997 ; DEL PRETE et al. 1998). Entretanto, outros pesquisadores não foram capazes de confirmarem esses resultados (YOSHIMURA et al. 1987 ; ROWBOTHAM et al. 1995 ; DUMONCEAU et al. 1996).

Resposta sorológica contra o Map foi detectada em pacientes com a DC, argumentando em favor do papel da micobactéria na etiologia da DC (ELSAGHIER et al. 1992 ; JUSTE et al. 2000), entretanto outros pesquisadores não deram suporte a essas observações (McFADDEN & HOUDAYER, 1988 ; BRUNELLO et al. 1991).

O isolamento do *M. avium* subsp. *paratuberculosis* em amostra de tecido lesionado em pacientes com DC é extremamente difícil (CHIODINI et al. 1984b ; GRAHAM et al.

1987 ; MOSS et al. 1992), especialmente pela baixa frequência ou pela presença de formas bacterianas alteradas ou esferoblastos (WALL et al. 1993).

Recentemente, o Comitê Científico da União Européia sobre Saúde e Bem Estar Animal revisou as possíveis ligações entre a DC e a paratuberculose, levando em consideração que:

- 1) O Map é um organismo que causa inflamação crônica no intestino (Doença de Johne) em bovinos, ovinos e caprinos, assim como em outros animais, incluindo coelhos e macacos.
- 2) A infecção causada pelo Map está disseminada nas criações de animais domésticos, especialmente bovinos, ovinos e caprinos, assim como em outros hospedeiros silvestres como coelhos, veados etc.
- 3) Os animais podem ser portadores sem evidenciarem sinais clínicos da doença ou tornarem-se reagentes aos testes sorológicos.
- 4) O Map é encontrado em grandes quantidades no intestino de animais doentes e em menores quantidades nos gânglios linfáticos, fígado baço e outros tecidos.
- 5) Animais clinicamente infectados podem eliminar 10^{12} organismos por mililitro de fezes. Animais subclínicamente infectados eliminam o organismo em quantidades menores. Vacas e ovelhas infectadas podem eliminar o Map, através do leite.
- 6) O Map pode sobreviver no ambiente ou nas pastagens por mais de 9 meses.
- 7) A infecção causada pelo Map é adquirida nos primeiros meses de vida, através das fezes.
- 8) Microscopicamente a paratuberculose nos animais apresenta-se tanto sob a forma multibacilar quanto paucibacilar ou linfocítica.
- 9) O Map possui crescimento muito lento. O cultivo em laboratório é trabalhoso, pouco sensível na detecção de pequena quantidade do organismo no ambiente e no alimento. O cultivo de fezes nos animais é considerado o padrão ouro para o diagnóstico mas é ainda demorado e dependente do organismo estar presente nas fezes.
- 10) Os ensaios imunológicos para detectar a infecção pelo Map possuem baixa sensibilidade, baixa especificidade, estando indisponíveis, particularmente na detecção do início do processo.
- 11) A análise genética revelou diferentes cepas do Map.
- 12) O Map contém 14-18 cópias de elemento de inserção (IS900) que pode ser utilizada para detectar a presença do ADN do Map. Esses testes de PCR podem ser muito sensíveis quando o processamento das amostras e as condições de reação são otimizadas.
- 13) O Map é mais resistente do que o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*. A completa destruição do Map não é assegurada pela pasteurização normal, nem através do HTST.
- 14) Há uma evidência preliminar de que o Map pode estar presente no leite humano. Isto poderia ser um achado significativo se os resultados forem confirmados.
- 15) A DC é

uma inflamação crônica do intestino no homem, apresentando algumas similaridades clínicas e patológicas à forma linfocítica / paucibacilar da paratuberculose nos animais. 16) A DC ocorre em países da Europa Ocidental com uma incidência geral de 5,6 por 100.000 indivíduos por ano. 17) Dados insuficientes estão disponíveis para comparar a incidência e prevalência da DC e paratuberculose assim como para determinar a ligação epidemiológica entre as duas doenças. 18) O Map tem sido detectado em aproximadamente 30% das amostras patológicas de pacientes com a DC e um percentual menor em pacientes saudáveis, utilizando o PCR com o IS900. 19) Os resultados utilizando PCR com o IS900 em extratos de intestino de pacientes com DC são conflitantes em diversos laboratórios. Vários estudos que obtiveram sucesso na detecção do Map em pacientes com a DC também detectaram o organismo em pequeno número em pacientes saudáveis. Outros estudos foram incapazes de detectar o organismo. 20) Pacientes com DC disparam uma resposta sorológica aumentada a muitos microorganismos, incluindo o Map. Isso pode ser simplesmente o reflexo de uma resposta imunológica aumentada em pacientes a muitos microorganismos em consequência do “intestino rompido”. 21) Poucos pacientes com CD mostram sinais de remissão quando tratadas com drogas contra a tuberculose, mas geralmente há recidiva. Novas drogas tais como rifabutina e antimicrobianos macrolídeos são ativos contra o *M. avium spp* são relatados como efetivos em pacientes com DC, embora recidivas aconteçam. Resultados de estudos experimentais terapêuticos bem controlados ainda não estão disponíveis. Concluíram que “As evidências disponíveis na atualidade são insuficientes para confirmar ou refutar que o *Mycobacterium paratuberculosis* seja o agente causal, ou de alguns casos, da DC no homem. Existe muita coisa por ser feita para garantir o aumento e urgência na atividade de pesquisa para resolver o problema” (HARRIS & LAMMERDING, 2001).

CAPÍTULO I

ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA PARATUBERCULOSE BOVINA EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL.

RESUMO

Descrevem-se os achados clínicos e patológicos da paratuberculose em uma criação intensiva de bovinos de leite no município de Capela de Santana, RS. Sinais clínicos foram observados em oito de um total de 345 bovinos e consistiam em diarreia crônica refratária ao tratamento, emagrecimento progressivo e queda da produção de leite. As principais lesões macroscópicas, observadas nos oito animais eutanasiados e necropsiados, incluíam intestino delgado com acentuado espessamento da parede e superfície mucosa de aspecto reticulado, semelhante às circunvoluções cerebrais, lesão essa perceptível através da serosa. A luz intestinal estava preenchida por conteúdo fluido e de aspecto leitoso. Os vasos linfáticos do mesentério mostravam-se mais evidentes, sendo que alguns tinham aspecto varicoso. Os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume e, ao corte, fluía grande quantidade de líquido leitoso. Focos de mineralização foram observados na íntima das artérias, nas válvulas cardíacas e na serosa do rúmen. Havia também edema das dobras do abomaso e do mesentério e atrofia do lobo caudado do fígado.

As principais lesões microscópicas incluíam enterite, linfadenite e linfangite granulomatosas que se caracterizavam por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, células epitelióides e células gigantes de Langhans que continham grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes. As lesões vasculares consistiam em degeneração e mineralização das túnicas íntima e média das artérias de grande calibre associadas à proliferação de colágeno. Havia calcificação da serosa do rúmen, atrofia hepatocelular difusa e hepatite granulomatosa multifocal. *Mycobacterium paratuberculosis* foi cultivado em meio de Herrold enriquecido com micobactina a partir de raspados do intestino em todas as oito amostras enviadas para exame bacteriológico.

Palavras-Chave: Paratuberculose, Map, doença de Johne, ruminantes, patologia.

ABSTRACT

The clinical and pathological aspects of bovine paratuberculosis in a dairy herd in the county of Capela de Santana, Rio Grande do Sul, southern Brazil are described. Clinical signs in eight cows out 345 cattle included chronic diarrhea refractory to treatment, progressive emaciation and decreased milk production. Necropsy findings included severe and diffuse thickening of the mucosa of the small intestine with exaggerated reticular pattern, reflected in the serosal surface, similar to cerebral gyri. Intestinal loops were filled with whitish watery contents. The lymphatic vessels of the intestinal serosa and of the mesentery were thickened and tortuous. The mesenteric lymph nodes were enlarged and, on cut surface, there were oozing of milky fluid. Plaques of mineralization were evident in the intima of larger arteries, in the endocardium of the heart valves and in the ruminal serosa. There was also edema of abomasal folds and atrophy of caudate lobe of the liver. The main histopathological findings were granulomatous enteritis, lymphadenitis and lymphangitis. The inflammatory infiltrate was composed of macrophages, epithelioid cells and Langhan`s giant cells containing large numbers of acid-fast bacilli. Vascular lesions included degeneration, calcification and collagen proliferation of the intima and media of larger arteries. Other microscopic lesions included calcification of the ruminal serosa, diffuse hepatocellular atrophy and multifocal granulomatous hepatitis.

1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enterite granulomatosa, crônica, infecciosa e que afeta ruminantes domésticos e silvestres (CHIODINI et al. 1984a ; KREEGER, 1991), cujo agente etiológico é *Mycobacterium paratuberculosis*. Trata-se de uma enfermidade de distribuição mundial. Nos Estados Unidos, um estudo sobre o isolamento do agente etiológico em linfonodos mesentéricos, revelou uma prevalência de 2,9% em bovinos de leite e 0,8% em bovinos de corte (MERKAL et al. 1987). Na África do Sul, há relatos da enfermidade em animais importados (HUCHZERMEYER et al. 1994).

A transmissão de *M. paratuberculosis* pode ocorrer por via intra-uterina, no período pós-natal através do colostro e, principalmente, pelas fezes de animais contaminados (SWEENEY, 1996). Bovinos que desenvolvem a doença clínica, em geral são aqueles infectados nas primeiras semanas de vida. A doença clínica manifesta-se geralmente em animais com idade superior a 2 anos (SWEENEY, 1996 ; RADOSTITS et al. 2000). Fatores estressantes, tais como parto e má nutrição, podem desencadear o aparecimento dos sinais clínicos (KREEGER, 1991 ; WHITLOCK & BUERGELT, 1996). A doença é mais freqüente em bovinos confinados em função da maior contaminação do ambiente pelas fezes (RADOSTITS et al. 2000).

A paratuberculose é responsável por perdas econômicas que ocorrem pela redução na produtividade, maior susceptibilidade a outras doenças, aumento dos custos sanitários e maior taxa de descarte precoce (HUTCHINSON, 1996). Estima-se que 5% dos bovinos com a doença clínica representam 50% dos animais infectados em um rebanho (RADOSTITS et al. 2000).

Diversos testes imunológicos auxiliam na identificação de portadores assintomáticos, porém não são definitivos no que se refere à prevalência da doença (STEHMAN, 1990).

As principais lesões macroscópicas ocorrem no intestino delgado e caracterizam-se por acentuado espessamento da mucosa, que assume aspecto rugoso e aumento de tamanho dos linfonodos mesentéricos. Os principais achados histopatológicos consistem em enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas associados à presença de bacilos álcool-ácido

resistentes em macrófagos (CHIODINI et al. 1984a ; KREEGER, 1991). Alterações vasculares degenerativas nas artérias e no endocárdio, referidas por alguns autores como arteriosclerose, também são descritas e provavelmente são causadas por distúrbios metabólicos associados à infecção (ALIBASOGLU et al. 1962 ; BUERGELT et al. 1978).

O *M. paratuberculosis* é incriminado, por alguns autores, como agente envolvido em uma ileocolite granulomatosa de humanos denominada doença de Crohn. No entanto, a participação do Map na etiologia desta enfermidade não está completamente esclarecida e requer maiores investigações (CHIODINI & ROSSITER, 1996).

No Brasil, um dos principais aspectos da epidemiologia da paratuberculose diz respeito à importação de bovinos infectados, de forma semelhante ao que ocorre na África do Sul. A doença já foi diagnosticada em bovinos importados e naqueles nascidos no país, filhos de pais importados. Os relatos são esporádicos e impedem uma estimativa das perdas econômicas em rebanhos infectados. Há seis descrições da doença na Região Sudeste, nos Estados do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915 ; DACORSO FILHO et al. 1960 ; SANTOS & SILVA, 1956 ; SILVA & PIZELLI, 1961 ; SILVA 1968) e Minas Gerais (NAKAJIMA et al. 1991), e duas na Região Sul, nos Estados de Santa Catarina (PORTUGAL et al. 1979) e do Rio Grande do Sul (RAMOS et al. 1986). A enfermidade foi reproduzida experimentalmente em ovinos e caprinos (SILVA, 1968 ; POESTER & RAMOS, 1994).

O presente estudo objetiva descrever o quadro clínico-patológico de casos de paratuberculose em bovinos em um rebanho leiteiro no Estado do Rio Grande do Sul.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Dados epidemiológicos e sinais clínicos da doença nos bovinos foram obtidos junto ao proprietário e através de visitas ao estabelecimento. Foram eutanasiados e necropsiados oito bovinos e coletados fragmentos de intestinos delgado (duodeno, jejuno, íleo incluindo a válvula íleocecal) e grosso (ceco, cólon e reto), mesentério, linfonodos mesentéricos,

retrofaríngeos, mediastínicos e supra-mamários, fígado, baço, vesícula biliar, pâncreas, rúmen, abomaso, rim, pulmão, encéfalo, coração, aorta, carótida, tireóide e paratireóide, útero e glândula mamária. Estas amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo rotativo a 5 µm e coradas com hematoxilina-eosina. Cortes dos intestinos, linfonodos, mesentério, fígado e pele foram corados pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Perls.

Foram coletados fragmentos da válvula íleo-cecal de todos os bovinos necropsiados e enviados para exame bacteriológico. A partir desse material, também foram feitos raspados da mucosa intestinal. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados pelo método de Ziehl-Neelsen. Amostras da mucosa do intestino foram congeladas a -20°C e posteriormente submetidas a isolamento em meio de cultivo específico de Herrold enriquecido com micobactina (STABEL, 1997). A identificação do microrganismo foi realizada de acordo com os critérios descritos por COLLINS (1996).

3. RESULTADOS

3.1 Histórico

Os primeiros casos da doença foram observados no mês de dezembro de 1997, em um estabelecimento localizado no município de Capela de Santana, RS. O rebanho era formado por 345 bovinos da raça holandesa que incluíam vacas em ordenha e vacas secas (todas importadas da Argentina), bezerras de até 6 meses de idade (filhas destas vacas nascidas no Brasil) e um touro (adquirido de outro tambo próximo da propriedade e que nasceu no Brasil). A idade das vacas com lesões de paratuberculose fora de 3 a 5 anos e o número de partos variou de 1 a 3 (Quadro 1). Do total, 220 vacas, importadas da Argentina, estavam em ordenha e eram mantidas em “free-stall”. Em agosto de 1997, todos os animais (345) foram submetidos a tuberculinização, através da prova caudal simples com tuberculina mamífera. Cinquenta e cinco bovinos foram reagentes ao teste, sendo encaminhados ao abate sanitário. Destes, 38 animais apresentavam lesões generalizadas de tuberculose e 17 mostravam lesões localizadas.

Quadro 1. Bovinos com paratuberculose necropsiados no Rio Grande do Sul

Bovino no.	Idade (anos)	Nº de partos	Período de gestação (meses)
1	4	1	. ^a
2	4	3	.
3	5	2	.
4	4	2	.
5	4	1	4
6	4	1	3
7	4	1	.
8	3	1	.

^a Vaca não-gestante

3.2 Sinais clínicos

Os sinais clínicos consistiam em diarreia esverdeada, intermitente, emagrecimento progressivo (Fig. 1), queda da produção de leite, desidratação e pêlos arrepiados e sem brilho. Duas vacas (bovinos 2 e 3) apresentavam eczemas crostosos ao redor do ânus. Todos os bovinos afetados foram retirados da ordenha, em função da baixa produção de leite. Estes animais foram medicados com diferentes antimicrobianos, porém a enfermidade mostrou-se refratária aos tratamentos. O quadro clínico era crônico. Os primeiros sinais clínicos foram observados até 6 meses antes da eutanásia dos bovinos acometidos e apareciam geralmente após o parto.



Fig. 1. Vacas com paratuberculose em mau estado geral e com sinais de diarreia (bovinos 1 a 4)

3.3 Achados de Necropsia

Os oito bovinos necropsiados estavam em mau estado nutricional. Havia atrofia serosa dos depósitos de gordura que era mais evidente no epicárdio. Em todos os casos, a parede do intestino delgado estava espessada e a lesão variava em intensidade (Quadro 2).

Bovino no.	Espessamento da mucosa do intestino delgado	Vasos linfáticos do mesentério mais evidentes	Mineralização das artérias	Mineralização da serosa do rúmen
1	++ ^a	+	+++	+++
2	++	++	++	-
3	+++	+++	++	-
4	++	++	+++	+++
5	+++	+++	+++	++
6	+++	+++	++	-
7	+++	+++	+	-
8	+	+	+	-

^a +++ Lesão acentuada, ++ moderada, + leve, - ausente.

Esta lesão era mais acentuada nos dois terços finais do intestino delgado. A serosa das alças intestinais mostrava-se irregular, com leves ondulações e apresentava aspecto reticulado. Em dois animais (bovinos 5 e 7), esta lesão era mais grave de modo que a serosa intestinal assumia a forma de mosaico. Secções transversais foram feitas em diversos segmentos dos intestinos.

No íleo, verificou-se que, naqueles casos em que a lesão era mais acentuada, não havia colapso completo das paredes do intestino de modo que este mantinha seu lúmen, mesmo sem conteúdo. A mucosa estava nitidamente espessada, quando comparada às demais camadas do intestino. A superfície mucosa mostrava-se irregular, de aspecto reticulado semelhante às circunvoluções cerebrais, com dobras transversais bem evidentes (Fig. 2). Havia conteúdo fluido e de aspecto leitoso acumulado entre as dobras da mucosa intestinal afetada. A inserção do mesentério às alças intestinais apresentava áreas com edema gelatinoso e translúcido.

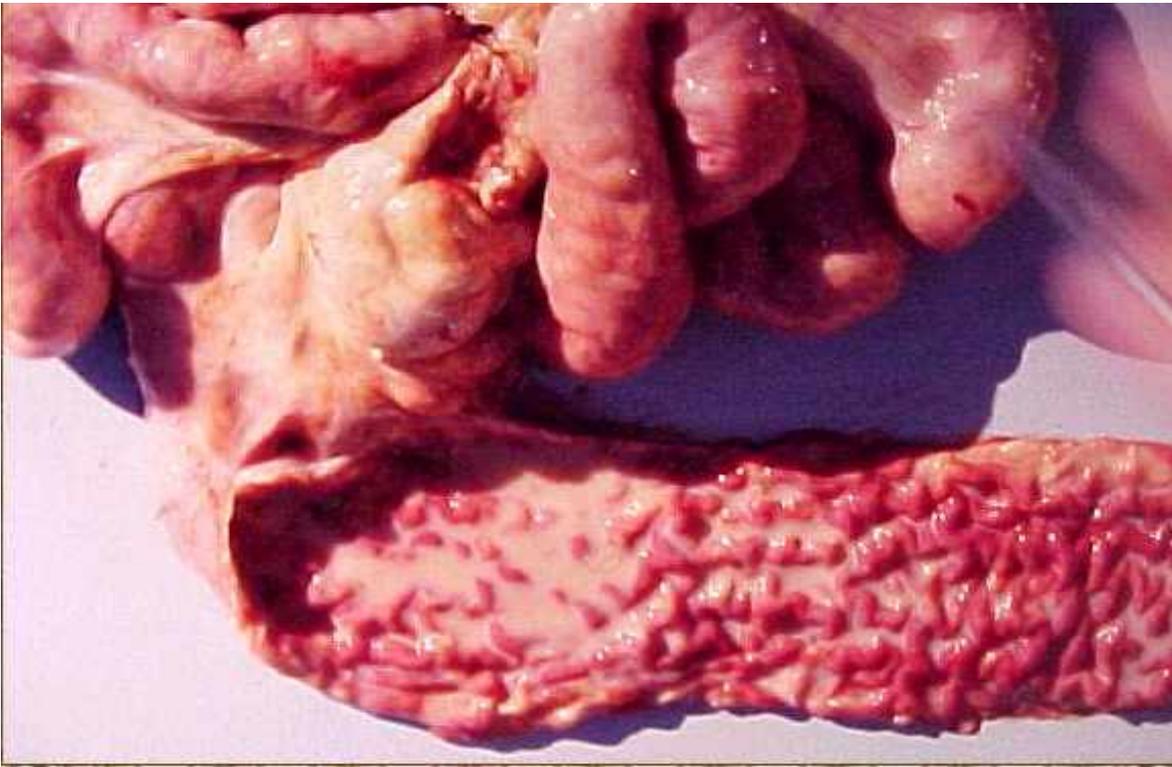


Fig. 2. Íleo com mucosa espessada com dobras transversais bem evidentes (bovino 2)

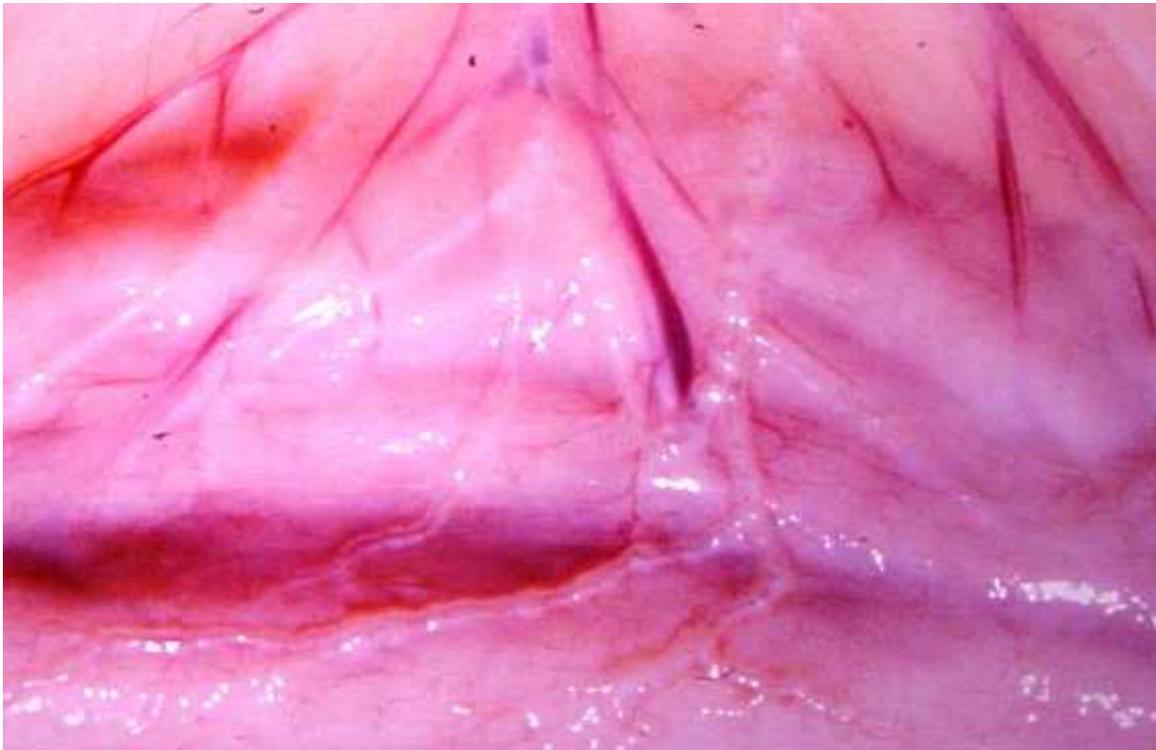


Fig. 3. Vasos linfáticos da serosa do intestino delgado dilatados e com aspecto varicoso

Os vasos linfáticos da serosa intestinal e do mesentério estavam mais evidentes e tinham aspecto varicoso (Fig. 3). Alguns linfáticos estavam preenchidos por líquido transparente. Outros eram esbranquiçados, firmes e de aspecto nodoso.

Os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume em até três vezes o seu tamanho normal. Ao corte, fluía a grande quantidade de líquido leitoso. A região cortical destes linfonodos era esbranquiçada e a região medular enegrecida. Em alguns casos, a cortical tinha coloração marrom-clara bem evidente. Nos linfonodos mesentéricos de um animal (bovino 1), observou-se, ao corte, a presença de pequenos nódulos de aspecto caseoso, de aproximadamente 0,5cm de diâmetro. Em todos os animais necropsiados, havia edema do mesentério, de intensidade leve a moderada, e em dois casos (bovinos 7 e 8), edema leve a moderado das dobras da mucosa do abomaso.

Mineralização da parede de artérias foi observada em todos os bovinos necropsiados. As lesões caracterizavam-se pela presença de placas esbranquiçadas, opacas, irregulares e que se salientavam na superfície interna dos grandes vasos. A intensidade das lesões era variável. Em dois animais (bovinos 7 e 8), estas alterações eram discretas e restringiam-se à base da aorta, à válvula mitral e às semilunares da aorta (Fig. 4). As lesões eram de intensidade moderada em três casos (bovinos 2, 3 e 6) e consistiam em calcificação de extensas áreas da superfície da aorta abdominal. Em três animais (bovinos 1, 4 e 5), havia acentuada mineralização da aorta abdominal, da artéria mesentérica e dos seus principais ramos e da artéria carótida.

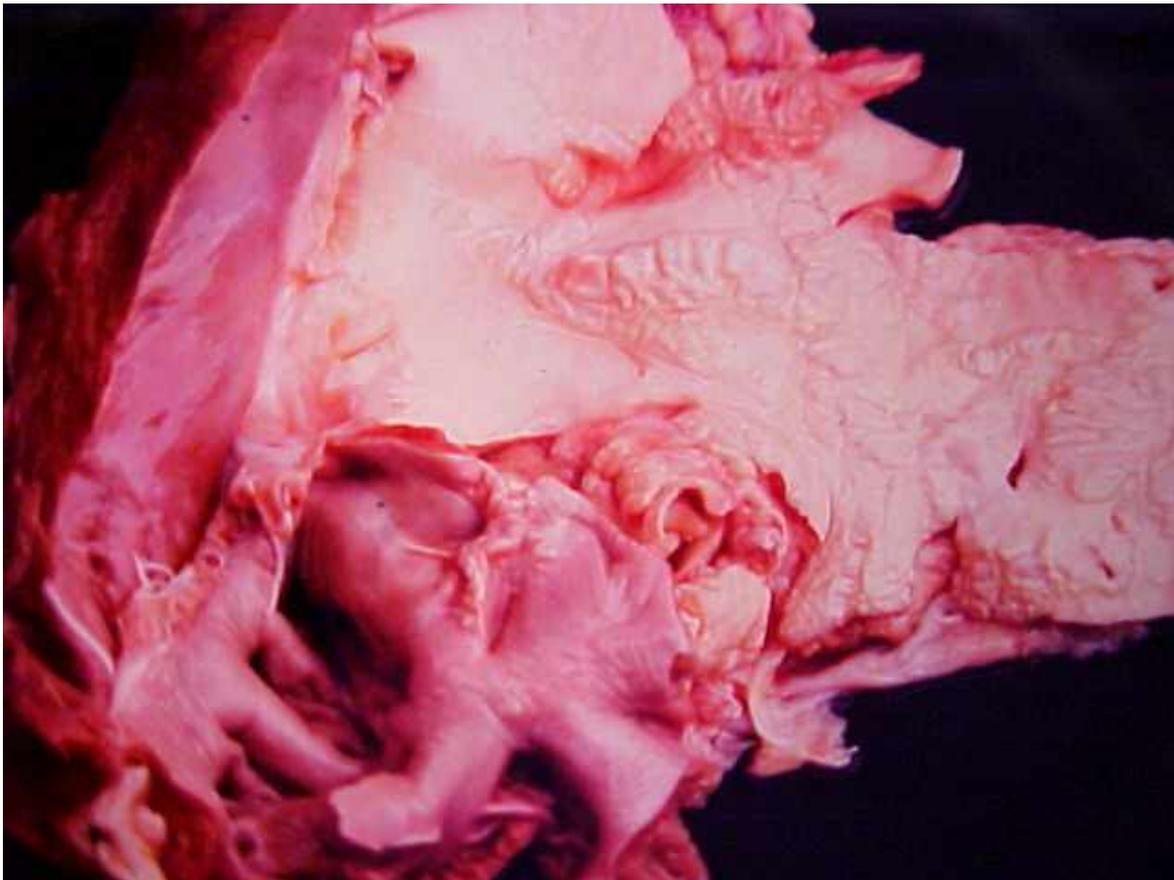


Fig. 4. Mineralização da paraede das válvulas seminulares da aorta (bovino 6)

Calcificação da serosa do rúmen foi observada em três bovinos (Fig.5). As lesões eram esbranquiçadas, estriadas ou granulares e, nas porções centrais, havia a formação de placas sólidas. Estas lesões eram observadas no saco dorsal e saco cego caudo-dorsal do rúmen.

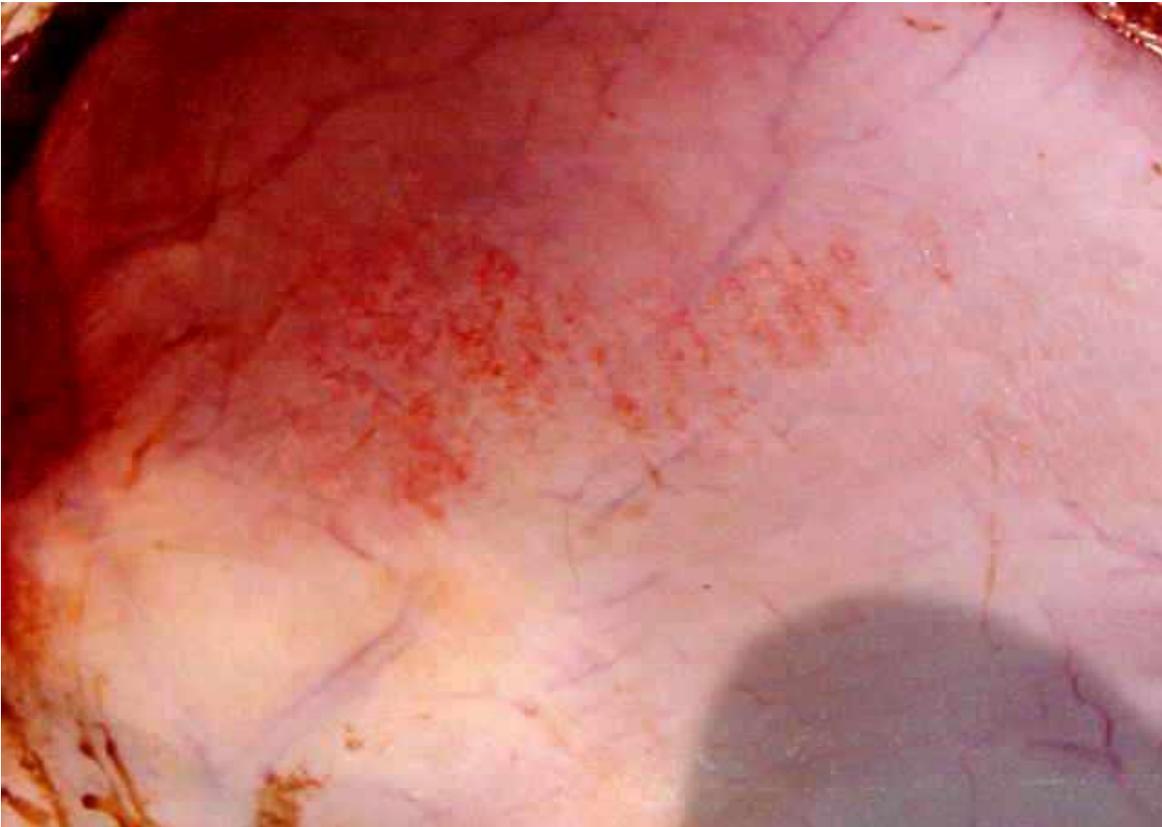


Fig. 5. Placas de calcificação sobre a mucosa do rúmen.

O fígado estava diminuído de tamanho, escuro e com os bordos afilados. Em cinco animais (bovinos 1 a 4 e 7), havia atrofia do lobo caudado do fígado. Esta lesão consistia em uma faixa de tecido fibroso esbranquiçado que se continuava com o parênquima hepático. Em todos os casos, o baço estava aumentado de volume e pulposo. Ao corte, observavam-se folículos linfóides muito proeminentes.

3.4 Achados histopatológicos

As principais alterações microscópicas, presentes em todos os bovinos necropsiados, foram observadas no intestino delgado, nos vasos linfáticos do mesentério e nos linfonodos mesentéricos e incluíam enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas.

No intestino, a lesão foi observada principalmente na mucosa e submucosa do jejuno e íleo e caracterizava-se pela presença de infiltrado inflamatório formado por quantidade variável de linfócitos, plasmócitos e principalmente macrófagos que, com frequência, assumiram aspecto epitelióide ou células gigantes de Langhans. As células macrofágicas geralmente continham grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes, positivos na técnica de Ziehl-Neelsen, o que as tornava mais evidentes (Fig.6).

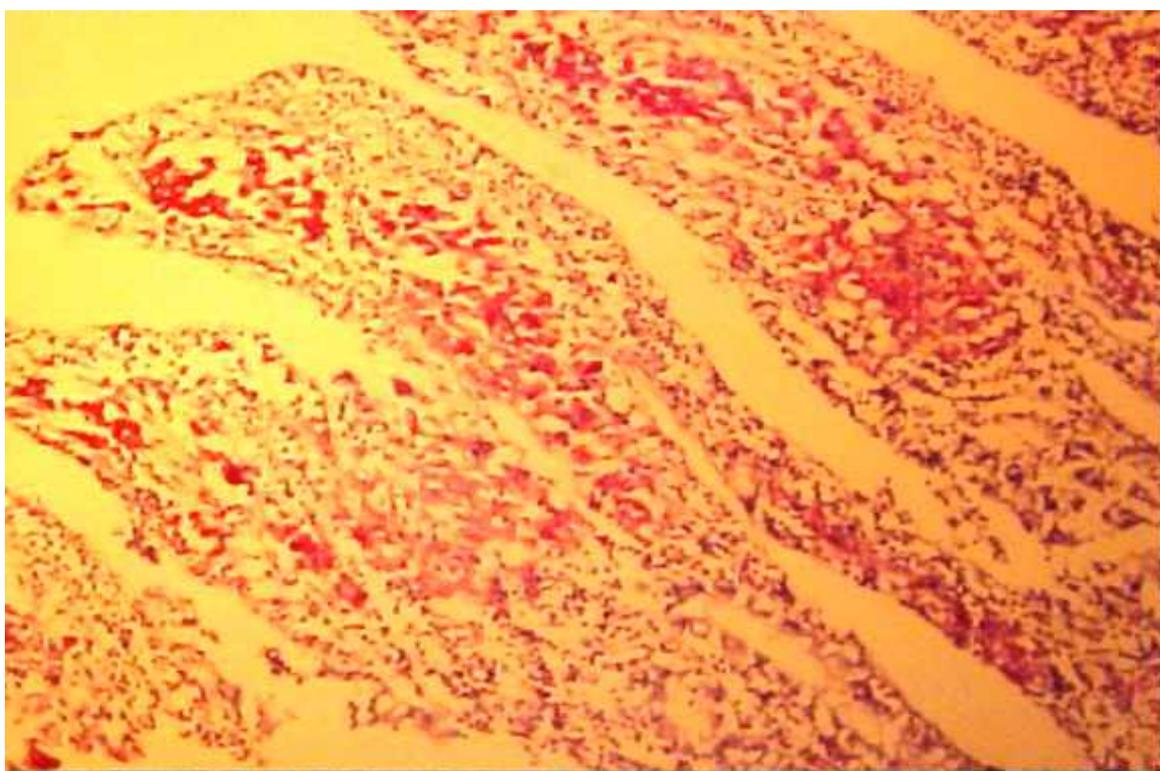


Fig. 6. Ileíte granulomatosa com aglomerados de macrófagos contendo bacilos álcool-ácido resistentes no ápice das vilosidades intestinais. Coloração de Ziehl-Neelsen, Objetiva 4.

As células inflamatórias eram observadas, com mais frequência, na mucosa intestinal, predominantemente no ápice das vilosidades, onde se agrupavam, ou então se distribuíam de forma difusa na lâmina própria. Havia dilatação dos vasos linfáticos das vilosidades intestinais. Muitas destas vilosidades estavam fundidas devido à presença de grande quantidade de células epitelióides na mucosa. Em dois animais (bovinos 5 e 6), a inflamação se estendia à porção ascendente do cólon proximal. Neste segmento do intestino grosso, macrófagos preenchidos por microrganismos álcool-ácido resistentes eram encontrados principalmente na submucosa.

Linfangite granulomatosa foi observada nos intestinos e mesentério (Fig. 7)

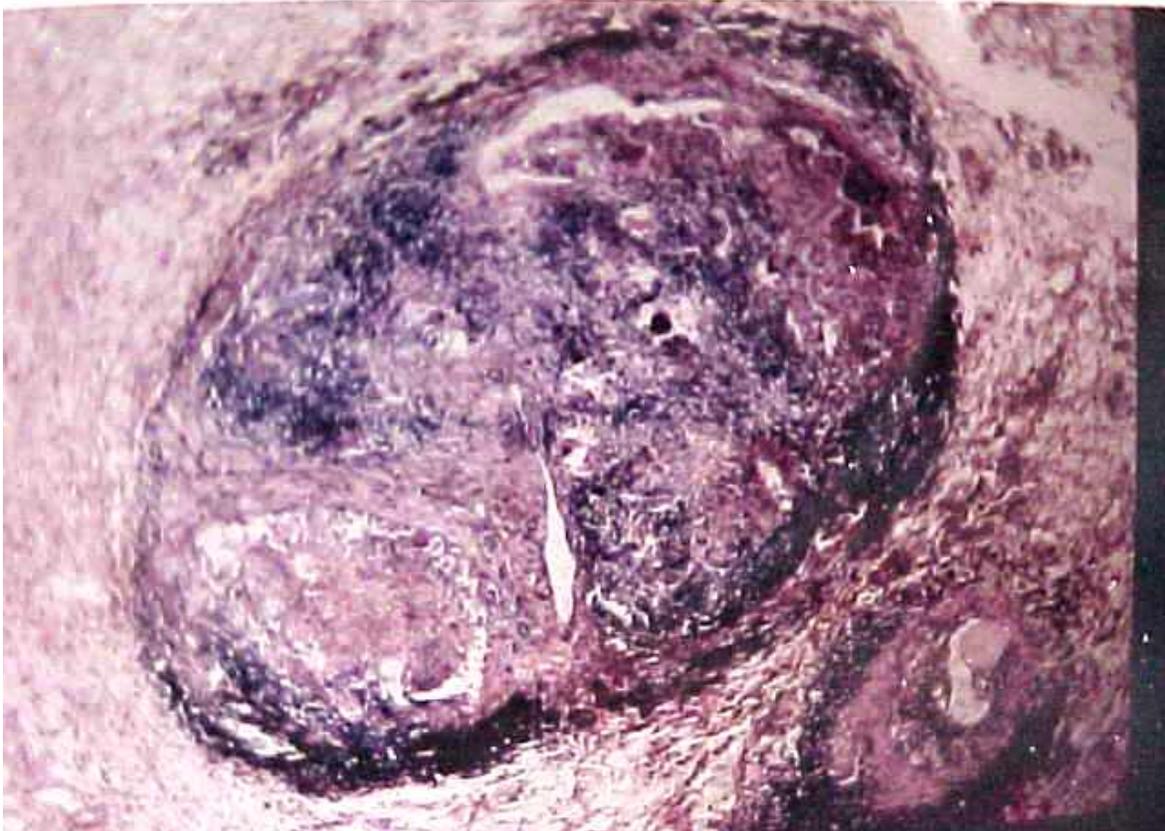


Fig. 7. Linfangite granulomatosa no mesentério. Obstrução de vaso linfático por numerosos macrófagos e aglomerados perivasculares formados por macrófagos e plasmócitos. Coloração de ZN. Objetiva 4

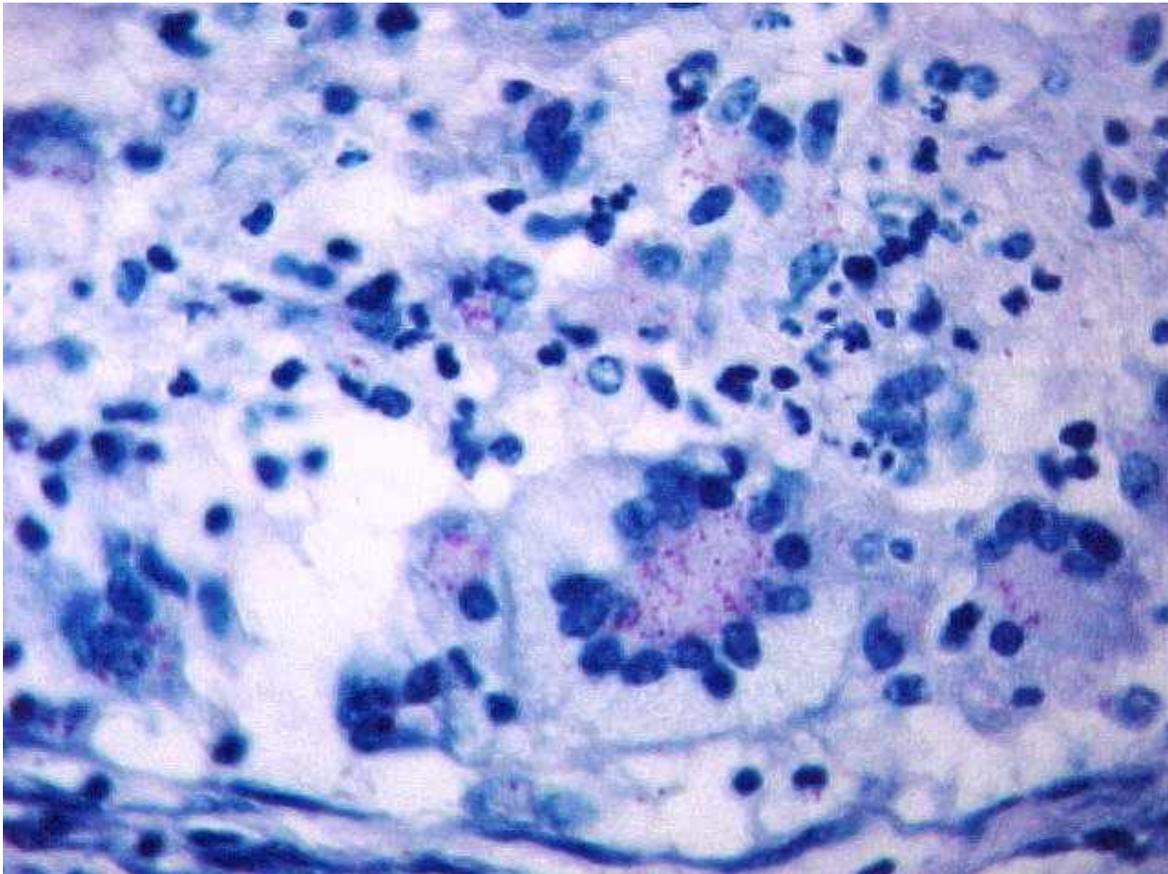


Fig. 8. Célula gigante de Langhans com bastonetes A.A.R. na parede de vaso linfático do mesentério. Coloração ZN, Obj. 100.

Na parede dos linfáticos e ao redor destes, havia infiltrado inflamatório formado por grande quantidade de linfócitos e plasmócitos e um número menor de macrófagos. Na luz destes vasos, havia grande quantidade de macrófagos e de células gigantes de Langhans, contendo bacilos Ziehl-Neelsen positivos (Fig. 8). Muitas destas células inflamatórias formavam aglomerados que se aderiam às válvulas e ao endotélio dos linfáticos provocando obstrução parcial ou total da luz. As células gigantes muitas vezes apresentavam citoplasma vacuolizado.

Nos linfonodos mesentéricos, a inflamação granulomatosa afetava as regiões cortical e medular e consistia em infiltrado composto por grande quantidade de macrófagos e de células gigantes de Langhans nos seios subcapsulares e medulares. Os centros germinativos apresentavam-se mais celulares e, em seus bordos, eram observados

macrófagos preenchidos por pigmento amarelo-ouro e refringente, sob a forma de grânulos, positivo na coloração de Perls para ferro (hemossiderina). Os linfonodos hepáticos apresentavam alterações inflamatórias semelhantes às dos mesentéricos, porém de menor intensidade. Nos linfonodos mesentéricos de um animal (bovino 1), havia pequenos focos de necrose caseosa, associados à inflamação granulomatosa. As lesões vasculares consistiam em degeneração e mineralização das túnicas íntima e média das artérias de grande calibre e fibroplasia.

No rúmen, áreas de calcificação intensamente basofílicas e discreta reação inflamatória macrofágica foram observadas na serosa. Por vezes, os macrófagos formavam células gigantes do tipo corpo estranho nos bordos dos focos de mineralização.

Hepatite granulomatosa multifocal foi observada em todos os bovinos e caracterizava-se pela presença de quantidade variável de microgranulomas formados por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes de Langhans. Em dois casos (bovinos 5 e 6), macrófagos contendo pequena quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes estavam associados a este infiltrado inflamatório. Havia também atrofia hepatocelular difusa que consistia em hepatócitos diminuídos de tamanho e achatados, de modo que a luz dos capilares sinusóides tornava-se mais evidente.

O baço apresentava hiperplasia folicular acentuada com centros foliculares reativos e hemossiderose perifolicular acentuada.

Lesões de pele na região perianal de dois bovinos (bovinos 1 e 3) incluíam dermatite necro-supurativa que consistia em focos de ulceração da epiderme acompanhada da presença de pústulas intracorneais e infiltrado linfoplasmocitário na derme.

Os esfregaços confeccionados a partir de raspados intestinais evidenciaram microorganismos positivos na técnica de Ziehl-Neelsen para bacilos álcool-ácido resistentes.

O cultivo em meio de Herrold enriquecido com micobactina revelou o crescimento de colônias bacterianas, após um período superior a seis semanas. Não houve crescimento bacteriano nas amostras semeadas em meio de Herrold sem micobactina. *Mycobacterium paratuberculosis* foi cultivado dos raspados do intestino em todos os oito casos.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico de paratuberculose neste estudo foi baseado nos dados epidemiológicos, nos sinais clínicos, nos achados de necropsia, nas lesões histopatológicas e no isolamento do agente etiológico da enfermidade em meio de cultivo específico. Os sinais clínicos e alterações macro e microscópicas observados nestes casos são semelhantes aos descritos na infecção pelo Map em bovinos (BUERGELT et al. 1978; CHIODINI et al. 1984a ; HUCHZERMEYER et al. 1994 ; WHITTLOCK & BUERGELT, 1996 ; RADOSTITS et al. 2000).

O sinal clínico de diarreia é descrito com frequência na paratuberculose em bovinos (WHITTLOCK & BUERGELT, 1996 ; RADOSTITS et al. 2000). Diarreia crônica, intermitente, acompanhada de emagrecimento progressivo, foi observada em todos os casos deste estudo. A diarreia ocorre devido à má absorção de nutrientes, em função da enterite granulomatosa, o que justifica a perda progressiva de peso e o mau estado corporal dos animais afetados (CHIODINI et al. 1984 ; WHITTLOCK & BUERGELT, 1996).

Os sinais clínicos encontrados na paratuberculose não são específicos, mas comuns a várias enfermidades que afetam o intestino e provocam diarreia crônica em bovinos adultos. Assim, salmonelose, parasitoses gastrintestinais e deficiência secundária de cobre devido ao excesso de molibdênio são doenças que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da doença de Johne (STEHMAN, 1990 ; RADOSTITS et al. 2000).

Neste relato, diarreia foi observada apenas em alguns animais do rebanho e afetava somente bovinos adultos. Este dado da epidemiologia contribuiu para o diagnóstico da enfermidade no estabelecimento estudado. Em um rebanho bovino, muitos animais podem ser portadores do agente embora, o número de animais com sinais clínicos seja pequeno (HUCHZERMEYER et al. 1994; RADOSTITS et al. 2000).

Mucosas intestinais espessada, irregulares, de aspecto reticulado e com dobras transversais bem evidentes são descritas como lesão característica da paratuberculose (CHIODINI et al. 1984a). No entanto, este achado não deve ser confundido com a alteração que ocorre no intestino logo após a morte devido à persistência do peristaltismo. Na paratuberculose, a aparência corrugada da mucosa do intestino não desaparece quando este é estirado (STEHMAN, 1990).

Lesões macroscópicas no intestino delgado, nos vasos linfáticos do mesentério e nos linfonodos mesentéricos e que correspondiam histologicamente à enterite, linfangite e

linfadenite granulomatosas, são usualmente descritas na paratuberculose em bovinos (BUERGELT et al. 1978 ; CHIODINI et al. 1984a). Estas lesões foram observadas nos animais necropsiados neste relato. No entanto, é importante frisar que nem sempre todas estas alterações estão presentes em um mesmo animal ou são pouco evidentes à necropsia (CHIODINI et al. 1984a).

Mineralização do endocárdio e da parede das artérias tem sido descrita na paratuberculose (ALIBASOGLU et al. 1962 ; BUERGELT et al. 1978). Esta alteração foi observada em todos os bovinos necropsiados neste estudo, embora não seja descrita com freqüência nesta enfermidade. A patogenia desta alteração vascular não está completamente esclarecida. Lesões vasculares observadas em várias doenças causadas por micobactérias, incluindo a paratuberculose, podem ser atribuídas à hipercalcemia associada a níveis elevados de vitamina D₃ (STABEL & GOLF, 1996). Sugere-se que estes distúrbios metabólicos estejam associados às extensas lesões granulomatosas nos intestinos (ALIBASOGLU et al. 1962). As alterações vasculares e a patogenia sugerida para o desenvolvimento destas 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 tem sido descrita em diversas doenças caquetizantes em bovinos tais como a paratuberculose e a tuberculose. Também é um achado de necropsia incidental em animais velhos (KITZ, 1927 ; ROBINSON & MAXIE, 1993). Trata-se, portanto, de uma lesão inespecífica.

Achados de necropsia menos específicos, tais como mau estado corporal das carcaças, atrofia serosa dos depósitos de gordura, edema das dobras do abomaso e atrofia do lobo caudado do fígado foram observados nos casos deste relato. Estes achados podem ser atribuídos aos distúrbios na absorção intestinal que resulta em diversas deficiências nutricionais, inclusive hipoproteinemia. Edema intermandibular associado à hipoproteinemia tem sido descrito na paratuberculose (DACORSO FILHO et al. 1960 ; WHITLOCK & BUERGELT, 1996) porém, não foi observado no presente estudo.

Os dados da epidemiologia e o quadro clínico-patológico da paratuberculose em bovinos precisam ser diferenciados dos da tuberculose. No rebanho estudado, todos os

animais que reagiram positivamente à prova intradérmica com tuberculina mamífera e foram enviados para abate, apresentaram lesões de tuberculose. No entanto, nenhum dos animais necropsiados com paratuberculose reagiu à prova caudal simples com tuberculina mamífera. Na paratuberculose em bovinos, as lesões granulomatosas no intestino e linfonodos mesentéricos são difusas e geralmente não estão associadas à necrose caseosa (BUERGELT et al. 1978). Por outro lado, na tuberculose, a reação granulomatosa nestes tecidos usualmente está acompanhada de necrose caseosa e tem distribuição focal (KITZ, 1927). É importante salientar que pequenos focos de necrose caseosa em linfonodos mesentéricos são ocasionalmente observados na paratuberculose de bovinos e restringem-se àqueles casos de evolução clínica mais prolongada (KREEGER, 1991). Outros achados que caracterizam a paratuberculose incluem a ausência de lesões nos linfonodos retrofaríngeos e mediastínicos. O isolamento do agente em meio de cultivo específico também confirmou a etiologia da doença neste estudo.

CAPÍTULO II

DOENÇA DE JOHNE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* (MAP) E, SUA INFECÇÃO EM REBANHO LEITEIRO, NO RS.

RESUMO

O *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) foi isolado de amostras do intestino delgado e linfonodos obtidas de 8 vacas Holandesas (3,5%) com doença de Johne, dentre 229 amostras cultivadas provenientes de um único rebanho leiteiro, no Estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil.

Cultivos inoculados em HEYM suplementados com micobactina produziram colônias identificadas como Map, segundo suas características fenotípicas tais como: crescimento lento, coloração álcool-ácido-resistente (a.a.r.) e dependência a micobactina. O laboratório de Referência da OIE na Argentina confirmou a amostra como Map. Não houve isolamento do agente em 221 amostras intestinais quando processadas, após 2 anos de sua colheita.

O teste de IDGA aplicado como “screening”, detectou 26 vacas (11,4%) positivas, dentre 228 animais testados e sacrificados em matadouro. O teste de ELISA adsorvido, utilizando o antígeno comercial PPA-3 detectou 125 (39,8%) amostras positivas e 47 (14,9%) suspeitas. O ELISA não adsorvido detectou mais 32 (10,1%) reagentes positivos e mais 18 (5,7%) animais suspeitos, dentre os 314 bovinos testados.

É enfatizada a ocorrência da doença de Johne tanto a forma clínica quanto a infecção subclínica no Rio Grande do Sul, sugerindo a adoção de medidas de controle sejam aplicadas na proteção dos rebanhos leiteiros nacionais.

Palavras-chave: Bovinos, doença de Johne, isolamento, Map, ELISA.

ABSTRACT

M. avium subsp. *paratuberculosis* (Map) was isolated from intestines and lymph nodes samples obtained from 8 Holstein cows (3.5%) with Johne's Disease among 229 inoculated samples from a unique dairy herd in Rio Grande do Sul State, South Brazil. Cultures on HEYM supplemented with mycobactin yielded colonies identified like Map by phenotypic properties: slow growth, acid-fast stain and mycobactin dependency. OIE Reference Laboratory in Argentine confirmed the strain like Map. The attempts to isolate the agent from 221 intestinal samples processed after 2 years were unsuccessful. The AGIDT applied as a screening test detected 26 positive cows (11.4%) among 228 tested animals at slaughterhouse. The absorbed ELISA test using PPA-3 antigen detected 125 positive animals (39.8%) and 47 (14.9%) suspect samples amongst 314 animals tested. Nonabsorbed ELISA test detected more 32 (10,1%) positive animals and 18 (5,7%) suspect samples than absorbed ELISA test. It's emphasized the occurrence of clinical and subclinical forms of Johne's disease in Rio Grande do Sul and should be necessity the adoption of control measures in the protection of national dairy herds.

Key Words: Bovine, Johne's disease, Isolation, Map, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Johne ou paratuberculose é uma enterite granulomatosa crônica, tendo como agente o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e caracterizada clinicamente por diarreia profusa, desidratação, perda de peso com permanência do apetite, queda brusca na produção de leite, caquexia e morte. Acomete mamíferos, especialmente os ruminantes e, entre esses, os bovinos leiteiros.

A participação do *M. a. paratuberculosis* como agente etiológico da doença de Crohn, uma enterocolite granulomatosa crônica do homem, é contraditória. Há, neste momento, fortes indícios que a enfermidade seja uma zoonose (HERMON-TAYLOR et al. 2000 ; RUBERY, 2001).

A doença de Johne em bovinos possui distribuição mundial, sendo relatada na maioria dos continentes (CHIODINI et al. 1984a).

Bovinos tornam-se infectados pelo *M. a. paratuberculosis* quando muito jovens. A doença manifesta-se, geralmente após 2 a 5 anos da infecção. A principal via de transmissão é oral quer pela ingestão de fezes, leite ou colostro contaminado. O agente ingerido sobrevive e multiplica-se em macrófagos intestinais e em gânglios linfáticos regionais e, posteriormente, há o desenvolvimento de uma enterite granulomatosa extensa, localizada na porção terminal do intestino delgado (íleo terminal, válvula ileocecal) e porção inicial do ceco, provocando uma grave enteropatia por má absorção. Os animais subclínicamente infectados eliminam pequenas quantidades do agente para o ambiente, através das fezes, pondo em risco os animais jovens e outros do mesmo rebanho (JONES, 2001).

A doença de Johne causa prejuízos econômicos à pecuária de leite pela redução na produtividade dos animais, pela eliminação prematura dos animais infectados, pela morte dos doentes, pela queda estimada em 15-16% na produção de leite, pelo aumento na incidência de mastites e por alterações reprodutivas que aumentam o intervalo entre partos e aumento dos custos veterinários (JOHNSON-IFEARULUNDU & KANEENE, 1997b). O impacto econômico total causado pela paratuberculose não foi totalmente quantificado (CHIODINI & VAN KRUININGEN, 1986 ; BENEDICTUS et al. 1987).

No Brasil, a literatura sobre a doença de Johne é escassa, pontual e, na maioria dos casos, ela foi tratada como achado anatomopatológico raro em laboratórios de

patologia em universidades e instituições de pesquisa. O primeiro registro da doença foi relatado por DUPONT (1915), em pequena nota no antigo Jornal do Commercio, que a descreveu em bovinos importados da raça Flamengo no então, Posto Zootécnico Federal, em Pinheiro, no Rio de Janeiro. SANTOS & SILVA (1956), no Rio de Janeiro, relataram um caso da doença de Johne em um touro da raça Holandesa, com idade de 6 anos proveniente de uma fazenda situada no município de Barra Mansa no Estado do Rio de Janeiro. DACORSO FILHO et al. (1960) diagnosticaram a paratuberculose bovina, através de exames clínicos e patológicos em 2 animais da raça Jersey, provenientes de um mesmo rebanho com histórico da enfermidade, no município de Petrópolis. Descreve ainda outro caso da enfermidade clínica em um touro da raça Holandesa, filho de mãe importada da Holanda de uma pequena propriedade leiteira no município de Bangu. SILVA & PIZELLI (1961), no município de Petrópolis, Rio de Janeiro, realizaram o diagnóstico de paratuberculose em bovino da raça Jersey. A Doença de Johne foi experimentalmente reproduzida em ovinos, inoculando uma emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal de um caso de paratuberculose bovina. Dos 5 ovinos inoculados, 4 (80%) apresentaram resposta a infecção oral pelo *M. a. paratuberculosis* de origem bovina. PORTUGAL et al. (1979), em Santa Catarina, relataram 2 casos de paratuberculose bovina. Um em touro da raça Normanda, autóctone, com 5 anos de idade, no município de Brusque e outro em uma fêmea da raça Holandesa importada da Holanda com 6 anos de idade, no município de Florianópolis. RAMOS et al. (1986), no Rio Grande do Sul, registraram a forma clínica da enfermidade em um touro da raça Holandesa, doador de sêmen, em central de inseminação artificial. A doença foi identificada, em Minas Gerais, por NAKAJIMA et al. (1991). POESTER & RAMOS (1994), reproduziram a infecção experimental em caprinos com amostra de Map de origem bovina. Dos 3 animais inoculados por via oral, 2 caprinos (66,6%) apresentaram sinais da doença com o isolamento do agente, após 2 anos da inoculação. No mesmo Estado, DRIEMEIER et al. (1999), descreveram os sinais clínicos e lesões anátomopatológicas detectadas em vacas com a doença de Johne, em um rebanho leiteiro com 345 animais, sendo o seu núcleo formador, vacas importadas da Argentina.

Os dados relativos à prevalência nos diversos continentes e países são variáveis e dependentes da metodologia utilizada. Na Europa, a prevalência da doença de Johne varia entre 7 a 55 %; nos Estados Unidos, a prevalência em seus rebanhos está associada ao tamanho do rebanho e 40% dos rebanhos com mais de 300 cabeças estão infectadas; na Austrália, a taxa de infecção em rebanho leiteiro varia de 9 a 22% (MANNING & COLLINS, 2001). Estudos realizados em vacas leiteiras de descarte nos estados da Pensilvânia, Wisconsin e Califórnia, estimaram a prevalência de 7,2%, 10,8% e 3,1%, respectivamente (ABBAS et al. 1983a ; WHITLOCK et al. 1985 ; BRAUN et al. 1990).

No Brasil, o primeiro estudo sobre a prevalência da Doença de Johne foi realizado por RIVERA (1996), em amostras de vacas com problemas reprodutivos no Mato Grosso do Sul e São Paulo. A prova de ELISA estimou em 45,51% de animais positivos e 14,7% de animais suspeitos, dentre 639 amostras testadas, em 5 rebanhos de corte. Estimou ainda em 65%, a prevalência da enfermidade de Johne, dentre 40 animais pertencentes a 4 rebanhos leiteiros do Estado de S. Paulo. LARANJA DA FONSECA et al. (2000), em S. Paulo, utilizando o teste de ELISA adsorvido estimaram a prevalência da paratuberculose em S. Paulo em 37,9% dentre 403 vacas com idade superior a 3 anos. Dos 20 rebanhos amostrados, 19 (95%) forneceram resultados positivos ao teste contra o Map.

O diagnóstico da paratuberculose bovina está baseado na detecção do agente etiológico ou na detecção da resposta imune. O isolamento em cultivo do Map, apesar de possuir pouca sensibilidade, ela é a técnica considerada “gold standard” no diagnóstico da infecção (WHIPPLE et al. 1991 ; COCITO et al. 1994). Diferentes metodologias foram desenvolvidas para o isolamento do Map, todas elas, objetivando manter o maior número de organismos viáveis e reduzindo contaminação microbiana pelo uso de antimicrobianos (WHIPPLE & MERKAL, 1983 ; WHIPPLE et al. 1991; STABEL, 1997 ; KALIS et al. 1999).

No Brasil, PORTUGAL et al. (1979) e RAMOS et al. (1986), realizaram as primeiras tentativas de isolamento do agente em amostras de fezes, obtendo sucesso no meio de Petragani, após a 4ª semana de cultivo (PORTUGAL et al. 1979); no meio de HEYM em amostras de intestino delgado, fezes e linfonodos mesentéricos, após a 6ª semana de cultivo (RAMOS et al. 1986).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico da paratuberculose bovina incluem: a imunodifusão em gel de agar (IDGA), ensaio imunoenzimático (ELISA), testes, relativamente fáceis de executar, mas com pouca sensibilidade (SHERMAN et al. 1984 ; COLGROVE et al. 1989 ; KREEGER, 1991 ; COLLINS, 1996). O teste de IDGA é de simples execução e utilizado na confirmação de um caso suspeito da doença (SHERMAN et al. 1984). O ELISA é o teste mais utilizado. Ele é mais sensível que o IDGA, detectando um número maior de animais subclínicamente infectados. A sensibilidade e especificidade dos vários ELISA são variáveis, estando associados a qualidade dos antígenos e reagentes utilizados (ABBAS et al. 1983b ; VANNUFFEL et al. 1994). O Map possui um grande número de determinantes antigênicos, alguns dos quais encontrados na *E. coli*, *Nocardia asteroides*, corinebactérias e outras micobactérias. Assim, a pré-absorção com o *M. phlei* remove a maioria dos anticorpos inespecíficos, enquanto que anticorpos para o *M. bovis* e *M. a. avium* podem permanecer na amostra testada (YOKOMIZO et al. 1985 ; De KESEL et al. 1992 ; GILOT & MISONNE, 1994; NIELSEN et al. 2001).

Outros métodos têm sido desenvolvidos, utilizando sondas de ácidos nucleicos combinados com reação da polimerase em cadeias ou PCR e o teste de interferon gama (VARY et al. 1990 ; COLLINS et al. 1993 ; WHIPPLE, et al. 1992 ; STABEL, 1996) os quais detectam um número maior de animais subclínicamente infectados, permitindo que sejam implementadas rapidamente medidas sanitárias tais como: manejo, segregação ou eliminação.

O objetivo do nosso trabalho foi isolar e identificar o *M. a. paratuberculosis* em amostras de tecido de animais com e sem sinais da doença de Johne em meio HEYM, estimando a prevalência da infecção, através de testes sorológicos em um rebanho infectado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Histórico do rebanho

Rebanho leiteiro localizado no município de Capela de Santana, RS era constituído inicialmente por 345 bovinos da raça holandesa, incluindo em sua maioria, vacas importadas da Argentina, além de 3 animais adquiridos em propriedades próximas. Este rebanho possuía, segundo veterinário da propriedade, histórico de tuberculose com eliminação de reagentes com e sem lesões, observadas em matadouro com inspeção federal (DRIEMEIER et al. 1999).

2.2 Colheita das amostras

No final de 1997 e início de 1998, foram necropsiadas um grupo, contendo 8 vacas com sinais clínicos suspeitos de doença de Johne e, amostras de tecidos foram colhidas e enviadas ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Entre junho e julho de 1998, os animais sobreviventes (234 animais), incluindo vacas, novilhas, terneiros, terneiras e touro foram eliminados em matadouro com Inspeção Federal (Freevale); destes somente 221 amostras foram colhidas no matadouro acrescidas das 8 amostras de vacas com Doença de Johne clínica, totalizando 229 amostras de intestino (íleo, válvula íleo-cecal, linfonodos regionais e ceco) para isolamento do Map e amostras de sangue os testes sorológicos.

2.3 Baciloscopia

Amostras de intestino, em número de 229, incluindo íleo terminal, válvula ileocecal, e gânglios linfáticos regionais foram colhidas, durante as necropsias realizadas na propriedade e posteriormente quando o rebanho foi eliminado em matadouro. A partir desse material foram realizados raspados da mucosa intestinal e confeccionadas 3 distensões por amostra. As lâminas foram secas, numeradas e guardadas em caixa de lâminas de vidro até o momento da coloração. As distensões foram coradas, através da técnica de Ziehl-Neelsen para a visualização de bastonetes álcool-ácido-resistentes (.a.a.r.).

2.4 Tratamento da amostra e cultivo

229 amostras de raspado da mucosa do íleo terminal, válvula ileocecal e gânglios regionais (1 a 2 g) foram adicionadas a 35 ml de água deionizada; misturadas e deixadas sedimentar a temperatura ambiente por 30 min. Após a sedimentação, o sobrenadante (20-25ml) foi removido e colocado em outro tubo limpo de 50 mL; centrifugadas a 1700x g por 20 minutos e o sedimento suspenso em 30 mL da solução de cloreto de benzalcônio a 0,3%, durante 18 horas em estufa a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 1700x g por 20min e o sedimento resultante foi suspenso com 1 mL de solução antimicrobiana, contendo (100 µg/mL de ácido nalidíxico; 100µg/mL de vancomicina e 50µg/mL de anfotericina B); incubadas durante 18 horas a temperatura de 37°C. A amostra tratada (0,2 mL) foi inoculada em 6 tubos, contendo o meio de Herrold com e sem micobactina J (2mg/L) (Allied Monitor, Fayette, USA) e a adição de 50µg/mL de ácido nalidíxico e 50µg/mL de vancomicina, segundo a técnica descrita em STABEL (1997).

2.5 Identificação do agente

Cada amostra processadas, em número de 229, foram inoculadas em 6 tubos, contendo HEYM (Herrold Egg Yolk Medium), sendo que 4 tubos continham micobactina e outros 2 não. As amostras cultivadas permaneceram em estufa a 37°C com observação quinzenal, por um período de 5 meses. A identificação do Map teve como critérios: o tempo de crescimento colonial, a morfologia e a dependência à micobactina (COLLINS, 1996; MANNING & COLLINS, 2001). As amostras isoladas foram enviadas pelo Ministério da Agricultura ao laboratório de referência da OIE, na Argentina para confirmação do agente através do PCR IS900.

2.6 Sorologia

Amostras de sangue foram colhidas em tubo de vidro a vácuo; centrifugadas e os soros transferidos para tubos de vidro limpos; mantidos a menos 15°C, e posteriormente, testadas, através da IDGA e ELISA para a detecção de anticorpos contra o Map. Os testes foram realizados nos laboratórios de imunologia da UFRRJ e de bacteriologia da UFRGS.

2.7 IDGA

A técnica de IDGA testou 228 amostras de soro bovino colhidas em matadouro, utilizando antígeno e controles comercializados (ImmuCell Co., Portland, ME, USA) para diagnóstico da doença de Johne.

2.8 ELISA

O ELISA testou um total de 314 amostras de bovinos, sendo 228 quando da eliminação em matadouro além de 85 outras quando da primeira visita a propriedade em 1997. ELISA indireto utilizou o antígeno protoplasmático (PPA-3) da amostra de *M. paratuberculosis* Strain 18 comercializados (Allied Monitor, Fayette, MI, USA) na identificação de anticorpos contra o *M. a. paratuberculosis*. O imunoenensaio foi realizado, segundo o protocolo fornecido pelo laboratório fabricante do antígeno (Allied Monitor, Fayette, MI, USA).

As placas de ELISA foram sensibilizadas com antígeno (72 mg/mL) em 0,05M de tampão carbonato, pH 9,6; incubadas, durante 18 horas a 5°C. Após esse tempo, elas foram lavadas por 3 vezes, com solução salina-Tween₈₀; deixadas secar e preenchidas com as amostras de soro adsorvido e não adsorvidos bem como seus controles.

As amostras foram descongeladas e os soros adsorvidos a igual volume (200µL) de uma suspensão de *M. phlei* (2,0µg/mL) (Allied Monitor, Fayette, MI, USA), onde permaneceram 18 horas sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos, em seguida, o soro adsorvido (40µL) foi diluído 1:50 adicionando 2,0 mL de PBS/Tween₈₀/Gelatina (pH 7,6), resultando numa diluição final de 1:100. O soro adsorvido e diluído (100 µL) foi colocado em triplicata a cada poço da placa sensibilizada; incubadas por 24 horas a 15°C e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBSTG a 6°C e seca. Adicionou-se então (100µl) o conjugado anti-IgG bovino com peroxidase produzido em coelho (Sigma, St. Louis, MO, USA); diluído (1:5000) e adicionado a cada poço da placa; incubando-a, durante 90 minutos sob refrigeração. Após esse tempo, a placa é lavada rapidamente com PBST₈₀G (3X), e um volume de (100µL) de substrato (ABTS) diluído em tampão citrato pH 4,0 adicionado a cada orifício e incubado a 21°C. Posteriormente, um volume (100µL) de uma solução a 0,1M de HF foi utilizado como solução bloqueadora da reação enzimática e, finalmente procedida a leitura espectrofotométrica, utilizando uma leitora de ELISA

(Labsystems Uniskan II, Finland) com filtro de 405 nm. Controles positivos e negativos (Allied Monitor, Fayette, Mi, USA) foram adicionados a cada placa sensibilizada.

A amostra foi considerada positiva quando a média das 3 densidades ópticas (DO) da amostra testada pelo 3 valores do controle negativo for igual ou superior 2,1. O teste foi considerado suspeito quando obtivermos um índice ELISA entre 1,5 a 2,0 e negativo quando o valor for 1,0 a 1,4.

2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, onde foram considerados os resultados dos testes de ELISA não adsorvidos e adsorvidos distribuídos em três diferentes faixas etárias. Foi utilizado o programa Minitab for Windows, tendo sido adotado o nível de significância de 0,05 segundo FLEISS (1981).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Map foi isolado de 8 vacas com alterações clínicas e anatomopatológicas da doença de Johne, dentre as 221 outras amostras inoculadas. As cepas isoladas de Map evidenciaram crescimento colonial entre a 6 e a 8ª semana de cultivo (Fig. 1)

As amostras isoladas no Rio Grande do Sul foram encaminhadas pelo Ministério da Agricultura, e este, ao Laboratório de Referência da OIE, na Argentina, em 1998, sendo posteriormente, confirmadas como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.



Fig. 1. Colônias do Map cultivadas em tubos HEYM com micobactina

Não houve isolamento do agente dentre as 221 amostras inoculadas e mantidas no meio de HEYM a 37°C por mais de 16 semanas. Este fato deveu-se, provavelmente ao: excessivo tempo transcorrido (24 meses) entre a colheita e o processamento laboratorial; pela conservação inadequada das amostras congeladas à -15°C ou ainda pela não adaptação

das cepas ao meio de cultivo utilizado. A contaminação bacteriana ou fúngica foi pequena e quando ocorreu, foi após a 14ª semana.

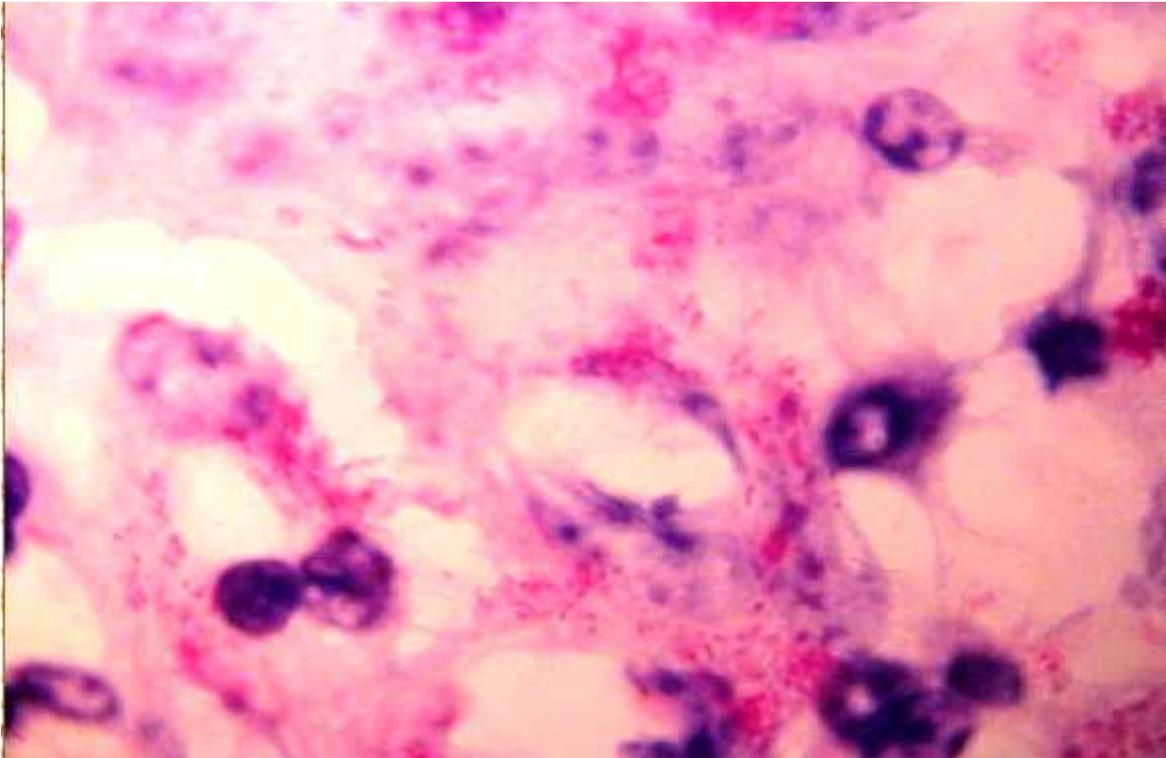


Fig. 2. Distensão da mucosa intestinal coradas pelo ZN e visualização de bastonetes A.A.R., Obj. 4.

A baciloscopia identificou, através do método de Ziehl-Neelsen, 8 amostras positivas, dentre as 229 amostras de esfregaços intestinais (Fig. 2)



Fig. 3. Teste de IDGA, evidenciando linha de identidade entre o antígeno e o anticorpo.

O teste de IDGA detectou 26 (11,40 %) animais positivos, dentre as 228 vacas com idade superior a 2 anos (Fig. 3). Este dado projetaria para o futuro, uma provável ocorrência de novos casos da forma clínica da paratuberculose, pois segundo SHERMAN et al., (1984) o teste de IDGA possui boa sensibilidade e excelente especificidade, sendo indicado principalmente, na rápida identificação de animais com sinais clínicos da enfermidade.

A distribuição dos resultados obtidos nos teste de ELISA com amostras não adsorvidas e adsorvidas pelo *M. phlei*, em diferentes faixas etárias, estão contidas na Tabela

1. Tabela 1. Relação entre faixas etárias e os testes de ELISA não adsorvido e adsorvido, em amostras de soro bovino, no RS.

Faixa Etária	Nº Amostras	E NÃO ADSORVIDO	L A D S O R V I D O	I A D S O R V I D O	S A	A	
< 2	103	31 ^a (30,1)	23 (22,3)	49 (47,5)	26 ^a (25,2)	11 (10,6)	66 (64,0)
2 – 4	69	35 ^b (50,7)	14 (20,2)	20 (28,9)	33 ^b (47,8)	10 (14,4)	26 (37,6)
> 4	142	91 ^c (64,0)	28 (19,7)	23 (16,2)	66 ^b (46,4)	26 (18,3)	50 (35,2)
TOTAL	314	157 (50,0)	65 (20,7)	92 (29,3)	125 (39,8)	47 (14,9)	142 (45,2)

P= positivo S= suspeito N= negativo
^{a,b,c} Letras minúsculas desiguais na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0.001)

O teste de ELISA com as amostras de soro adsorvidas detectou reagentes positivos em 125 (39,8%) bovinos, dentre as 314 amostras testadas. O mesmo teste aplicado às amostras não tratadas detectou 157 (50,0%) amostras positivas. O processo de adsorção, utilizando o *M. phlei* reduziu significativamente (p<0,01) o percentual de amostras positivas de 50,6% para 39,4%. Os dados obtidos podem estar, em parte, associados à infecção pesada, pois houve nesse rebanho um grande número de vacas com a forma clínica e, aproximadamente, 25% de reagentes positivos com idade inferior a 24 meses, dentre as 105 terneiras testadas. A diferença significativa entre essas estimativas entre os 2 testes deveu-se, em parte, às reações cruzadas com outros agentes tais como a *E. coli*, *Nocardia asteroides*, corinebactérias e outras micobactérias, conforme foi salientado em muitos trabalhos (YOKOMIZO et al. 1985 ; De KESEL et al. 1992 ; GILOT & MISSONE, 1994 ; NIELSEN et al. 2001).

O antígeno PPA-3 é extraído da cepa Strain 18 e, utilizado em muitos levantamentos epidemiológicos e provas diagnósticas da doença de Johne, durante décadas, era, na verdade, o *M. avium* sorovar 2, e que, segundo CHIODINI (1993) poderia até certo ponto, ter comprometido inquéritos epidemiológicos sobre a doença de Johne onde foram utilizados. Talvez isso possa ter contribuído, em parte, para a nossa estimativa de prevalência da infecção pelo Map, mesmo que NIELSEN et al. (2001), na Dinamarca, não tenham

evidenciado diferença significativa no teste de ELISA, utilizando os antígenos do *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e do *M. avium* subsp. *avium* sorovar 2.

Foi evidenciado maior número de reagentes positivos nos animais mais velhos utilizando o ELISA não adsorvido ($X^2=34,07$; $p<0,001$) assim como pelo ELISA adsorvido ($X^2=22,64$; $p<0,001$). Outro dado que corrobora com a infecção pesada seria a ausência de diferença estatística significativa entre as 3 faixas etárias trabalhadas, mesmo havendo uma infecção maior nos animais mais velhos. Possivelmente infecções por outras micobactérias, possa ter sido detectadas pelo teste, em especial, o *M bovis*, pois houve relatos de vários casos de reação cutânea à tuberculina no teste ano-caudal e casos de tuberculose generalizada observadas em matadouro, em animais eliminados deste mesmo rebanho. NIELSEN et al. (2001), afirmaram que os testes sorológicos em uso para diagnóstico da paratuberculose bovina podem dar resultado falso positivos, especialmente na tuberculose aviária e tuberculose bovina.

Houve um número maior de animais positivos ao teste de ELISA nos animais mais velhos considerando as 3 faixas etárias. Entretanto não houve diferenças significativas entre os animais positivos e as faixas etárias crescentes. Nossos dados não confirmam as observações de muitos autores (CHIODINI et al. 1984a ; COCITO et al. 1994 ; COLLINS, 1996) na qual a distribuição dos reagentes é dependente da natureza crônica, da infecção latente e patogenia particular da paratuberculose bovina. Talvez a pressão de infecção no nosso caso tenha alterado o padrão médio observado.

As estimativas nacionais relativas à doença de Johne, de uma maneira geral, possuem um pequeno número de rebanhos testados, considerando o número de rebanhos leiteiros brasileiros. Entretanto, os levantamentos sorológicos realizados, através do ELISA adsorvido são variáveis, estimando sua prevalência entre 18 a 38% dos animais. Os dados obtidos em nosso trabalho são bem superiores aos obtidos por FERREIRA et al. (2001) no Rio de Janeiro e semelhantes aos obtidos por LARANJA DA FONSECA et al. (2000), em São Paulo e aos de RIVERA (1996), no Mato Grosso.

4. CONCLUSÕES

O Map foi isolado e identificado de amostras de íleo, válvula íleocecal e linfonodos regionais em cultivo de todas as vacas com a forma clínica da enfermidade.

Detectou-se anticorpos contra o Map em amostras de soro testadas pela IDGA e ELISA em um grande número de animais infectados subclínicamente.

O dois tratamentos (tratados e não tratados) aplicados às amostras de soro evidenciaram resultados diferentes. As amostras de soro que foram pré-adsorvidas com o *M. phlei* evidenciaram uma redução significativa no percentual de reagentes a prova de ELISA, reduzindo assim a presença de anticorpos indesejáveis ao teste.

CAPÍTULO III

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO CAUSADA PELO *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* (Map) EM REBANHOS LEITEIROS DO RIO GRANDE DO SUL.

RESUMO

A prevalência da infecção causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* foi estimada em 35 rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, através do ensaio imunoenzimático adsorvido, utilizando antígeno PPA-3 comercial. O teste de ELISA identificou 558 animais positivos (44,6%), dentre as 1316 amostras testadas. A infecção foi detectada em 35 (97,2%) dos 36 rebanhos amostrados e esteve presente em todos os 25 municípios trabalhados. A infecção causada tanto pelo Map está amplamente disseminada nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Prevalência, paratuberculose bovina, sorologia, ELISA

ABSTRACT

The prevalence of Map infection was estimated in 35 bovine dairy herds in Rio Grande do Sul State by absorbed ELISA using PPA-3 commercial antigen. The ELISA test identified 558 positive animals (44.6%) among 1316 samples tested. The infection was detected in 35 (97.2%) from 36 herds sampled and was present in all 25 countries performed. The Map infection was disseminated in bovine dairy herds in Rio Grande do Sul.

1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose bovina ou doença de Johne é uma doença intestinal crônica causada por uma micobactéria denominada *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), caracterizada especialmente por diarreia prolongada e resistente a tratamentos. O processo inflamatório crônico não impede a ingestão de alimentos, mas produz má absorção de nutrientes, contribuindo assim com diarreia intermitente, perda de peso rápida, fraqueza geral e morte.

A paratuberculose pode ser um problema sanitário sério, especialmente nas criações de bubalinos, ovinos, caprinos e animais silvestres como: veados, alces, lhamas e alpacas. Infecções esporádicas foram registradas em suínos, equinos, preás, coelhos, primatas e no homem (MORGAN, 1999).

A doença foi descrita pela primeira vez, em 1895, na Alemanha, por Johne e Frothingham e, posteriormente, registrada em países da Europa e mais tarde nas Américas, Ásia, África e Austrália. A enfermidade possui distribuição mundial (COCITO et al. 1994).

Os prejuízos econômicos relacionados com a paratuberculose (doença e / ou infecção) são difíceis de serem quantificados, pois envolvem perdas diretas e indiretas com a enfermidade em determinada região ou país. Além disso, deveriam ser incluídas outras variáveis importantes tais como: o custo social, o custo genético, o custo industrial e o custo em Saúde pública (KENNEDY & BENEDICTUS, 2001)

A forma clínica e subclínica da enfermidade de Johne causa prejuízos econômicos na pecuária de leite e corte, pela eliminação de animais infectados; pela morte de doentes; pela queda na produção de leite, estimada em 15-16%; pelo aumento na incidência de mastites e por alterações reprodutivas que ampliam o intervalo entre partos. Nos Estados Unidos, as perdas econômicas estão estimadas em mais de 1,5 bilhões por ano (BUERGELT & DUNCAN, 1978 ; BENEDICTUS et al. 1987 ; JONES, 1989 ; WILSON et al. 1996).

A doença de Johne possui basicamente 2 formas de apresentação: uma forma clínica com diarreias incoercíveis, emagrecimento rápido e fraqueza que invariavelmente leva a morte e, outra forma denominada subclínica, onde nenhum sinal clínico é perceptível mas o hospedeiro dissemina o agente no ambiente, tornando-se fonte de risco para a população bovina ou para populações de outras espécies (RADOSTITS, 2000).

A literatura nacional sobre a doença de Johne é muito pequena e, na maioria dos casos, ela foi considerada como achado intestinal raro e didático para ensino nas escolas de veterinárias. A forma clínica da paratuberculose bovina tem sido detectada e relatada, esporadicamente por pesquisadores nos Estados do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915 ; SANTOS & SILVA, 1956 ; DACORSO FILHO et al. 1960 ; SILVA & PIZELLI, 1961) ; em Santa Catarina (PORTUGAL et al. 1979), Rio Grande do Sul (RAMOS et al. 1986 ; DRIEMEIER et al. 1999 ; GOMES et al. 2001) e Minas Gerais (NAKAJIMA et al. 1991).

No final da década de 90, um primeiro sinal de alerta surgiu quando muitos casos da forma clínica foram diagnosticados em um rebanho bovino leiteiro do município de Capela de Santana, Rio Grande do Sul onde mais de 300 animais foram importados da Argentina. Nessa ocasião, a doença foi confirmada, através do diagnóstico clínico, anatomopatológico e bacteriológico (DRIEMEIER et al. 1999).

A técnica diagnóstica considerada “Gold Standard” é o isolamento do Map em meio de cultivo com a adição de antimicrobianos e fatores de crescimento bacteriano específicos. O processamento laboratorial é trabalhoso e o tempo de crescimento colonial extremamente demorado, levando cerca de 8 a 16 semanas a 37° C (WHIPPLE et al. 1991).

Inúmeras técnicas diagnósticas como a fixação do complemento (COLGROVE et al. 1989); imunodifusão em gel de agar (SHERMAN, 1984); ensaio imunoenzimático (YOKOMIZO et al. 1985) e o teste do interferon gama (STABEL, 1996) são utilizadas na identificação da infecção pelo Map (COLLIS, 1996).

O diagnóstico sorológico populacional é realizado preferencialmente, através do teste de ELISA que é um teste econômico, prático, rápido, útil e disponível na quantificação da infecção em propriedades rurais e rebanhos. O teste, ao mesmo tempo, é o primeiro passo prático no controle e prevenção da paratuberculose bovina (COLLINS, 1996).

Recentemente, estudos epidemiológicos sobre a paratuberculose nos animais vêm utilizando o teste de ELISA adsorvido para estimar a prevalência da infecção no gado leiteiro. COLLINS et al., (1994), no Wisconsin, relataram que 50% dos rebanhos leiteiros e 7,3% dos animais eram sorologicamente positivos. BRETT (1998) *apud* KENNEDY & BENEDICTUS (2001), na Nova Zelândia, estimou a prevalência da infecção em 60% dos rebanhos leiteiros. ÇETINÇAYA et al. (1998), na Inglaterra e país de Gales, estimaram a

prevalência em 17% dos 2.953 rebanhos testados. GASTEINER et al. (1999), na Áustria, estimaram a prevalência da infecção em 2% dos animais e 7% dos 2.757 rebanhos leiteiros testados, utilizando o ELISA. Das 87,5% das propriedades positivas somente um animal foi detectado no teste como positivo. BOELAERT et al. (1999), na Bélgica, estimaram a prevalência da infecção em 32% em bovinos leiteiros; 30% em rebanhos mistos e 7% em rebanhos de corte dos 594 rebanhos testados pelo ELISA comercial. KALIS et al. (1999), na Holanda, estimaram a prevalência da infecção em 51% dos 113 rebanhos testados, através do isolamento do Map. MUSKENS et al. (1999), na Holanda, estimaram a prevalência em 55% dos 378 rebanhos e de $2,5 \pm 3,2\%$ dos animais em cada propriedade positiva, através do ELISA. NIELSEN et al (2000), na Dinamarca, estimaram a prevalência dos rebanhos leiteiros entre 5 a 13 % das 8.071 amostras de leite testadas pelo ELISA.

No Brasil, as primeiras estimativas epidemiológicas, envolvendo uma preocupação com a paratuberculose bovina ou doença de Johne são recentes e bem escassas. RIVERA (1996), no Mato Grosso do Sul, estimou em 45,5% das 639 amostras testadas pelo ELISA em 5 rebanhos de corte com animais com problemas reprodutivos. Estimou em 65% a prevalência da infecção, dentre 40 animais testados de 4 rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. LARANJA DA FONSECA et al. (2000), em São Paulo, utilizando o teste de ELISA comercial americano estimaram a infecção em 37,9% das 403 vacas testadas em 20 rebanhos leiteiros. FERREIRA et al. (2001) no Rio de Janeiro, estimaram em 18% das 1004 amostras, através do kit comercial australiano. GOMES et al. (2001), no Rio Grande do Sul, isolaram e identificaram o Map em amostras de 8 vacas com a doença de Johne de um plantel importado da Argentina. Estimaram a infecção em 39,8% dos 314 bovinos testados, pelo ELISA de um único rebanho através do teste de ELISA adsorvido. O teste de IDGA detectou 26 animais positivos (11,4%) entre os 228 testados.

O descarte dos animais positivos e o corte na transmissão oral-fecal da mãe para sua descendência são medidas fundamentais no controle da enfermidade. O descarte também acontecerá com os filhos de mães positivas. Manter os recém nascidos em ambiente limpo recebendo leite de vacas sadias. Reduzir o contato de animais jovens com adultos. Apesar das limitações de ordem prática, limpar botas e utensílios antes de tratar dos animais jovens. Manter ingredientes da dieta dos jovens longe do contato de fezes e evitar fornecer sobra da alimentação dos adultos para os jovens. Estabelecer um programa de controle da doença

específico para a propriedade com veterinário que conheça realmente a enfermidade (ROSSITER & BURHANS, 1996 ; COLLINS, 1996).

O objetivo desse estudo foi estimar a prevalência da paratuberculose bovina em diversos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, detectando anticorpos contra o Map através da aplicação do ELISA adsorvido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Bovinos, principalmente fêmeas leiteiras da raça Holandesa, com idade superior a 24 meses provenientes de 36 rebanhos leiteiros distribuídos em 25 diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul foram submetidas a colheita de sangue.

As amostras de sangue foram colhidas e enviadas ao Laboratório do Departamento de Patologia Clínica Veterinária (DPCV) da Faculdade de Veterinária da UFRGS, entre janeiro de 2000 a novembro de 2002.

Todos os rebanhos exceto um possui a histórico da enfermidade com isolamento do Map.

2.2 Sorologia

Amostras de sangue foram colhidas em tubo de vidro a vácuo; centrifugadas e os soros transferidos para tubos de vidro limpos; mantidos a menos 15°C, e posteriormente, testadas, através do teste de ELISA adsorvido para a detecção de anticorpos contra o Map, segundo GOMES et al. 2001.

2.3 ELISA

O ELISA testou um total de 1316 amostras de bovinos. ELISA indireto utilizou o antígeno protoplasmático (PPA-3) da amostra de *M. paratuberculosis* Strain 18 comercializado (Allied Monitor, Fayette, MI, USA) na identificação de anticorpos contra o Map.

O imunoenensaio foi realizado, segundo o protocolo fornecido pelo laboratório fabricante do antígeno (Allied Monitor, Fayette, MI, USA). As placas de ELISA foram sensibilizadas com antígeno (72 mg/mL) em 0,05M de tampão carbonato, pH 9,6; incubadas, durante 18 horas a 5°C. Após esse tempo, elas foram lavadas por 3 vezes, com solução salina-Tween₈₀; deixadas secar e preenchidas com as amostras de soro adsorvido bem como seus controles. As amostras foram descongeladas e os soros adsorvidos a igual volume (200µL) de uma suspensão de *M. phlei* (2,0µg/mL) (Allied Monitor, Fayette, MI, USA), onde permaneceram 18 horas sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos, em seguida, o soro adsorvido (40µL) foi diluído 1:50 adicionando

2,0 mL de PBS/Tween₈₀/Gelatina (pH 7,6), resultando numa diluição final de 1:100. O soro adsorvido e diluído (100 µL) foi colocado em triplicata a cada poço da placa sensibilizada; incubadas por 24 horas a 15°C e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBSTG a 6°C e seca. Adicionou-se então (100µl) o conjugado anti-IgG bovino com peroxidase produzido em coelho (Sigma, St. Louis, MO, USA); diluído (1:5000) e adicionado a cada poço da placa; incubando-a, durante 90 minutos sob refrigeração. Após esse tempo, a placa é lavada rapidamente com PBST₈₀G (3X), e um volume de (100µL) de substrato (ABTS) diluído em tampão citrato pH 4,0 adicionado a cada orifício e incubado a 21°C. Posteriormente, um volume (100µL) de uma solução a 0,1M de HF foi utilizado como solução bloqueadora da reação enzimática e, finalmente procedida a leitura espectrofotométrica, utilizando uma leitora de ELISA (Labsystems Uniskan II, Finland) com filtro de 405 nm. Controles positivos e negativos (Allied Monitor, Fayette, Mi, USA) foram adicionados a cada placa sensibilizada.

A amostra foi considerada positiva quando a média das 3 densidades ópticas (DO) da amostra testada pelo 3 valores do controle negativo for igual ou superior 2,1. O teste foi considerado suspeito quando obtivermos um índice ELISA entre 1,5 a 2,0 e negativo quando o valor for 1,0 a 1,4 (GOMES et al. 2002)

2.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, onde foram considerados os resultados dos testes de ELISA não adsorvidos e adsorvidos distribuídos em três diferentes faixas etárias. Foi utilizado o programa Minitab for Windows, tendo sido adotado o nível de significância de 0,05 segundo FLEISS (1981).

3. RESULTADOS

Os resultados dos testes sorológicos, utilizando a técnica do ELISA adsorvido na detecção de anticorpos contra o Map em amostras de bovinos leiteiros estão contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes de ELISA, utilizando os antígenos PPA-3 em diferentes rebanhos leiteiros, no RS.

Nº Rebanhos	Nº Amostras	E P (%)	L (%)	I S (%)	A (PPA-3) N (%)	Municípios
1	15	4 (26,6)		4 (26,6)	7 (46,6)	Livramento
2	25	3 (12,0)		2 (8,0)	20 (80,0)	Glorinha
3	20	8 (40,0)		1 (5,0)	11 (55,0)	Independência
4	22	7 (31,8)		4 (18,1)	11 (50,0)	Horizontina
5	17	10 (58,8)		3 (17,6)	4 (23,5)	Criciumal
6	21	10 (47,6)		3 (14,2)	8 (38,0)	São Martinho
7	25	13 (52,0)		4 (16,0)	8 (32,0)	Santo Augusto
8	25	16 (64,0)		3 (12,0)	6 (24,0)	Santo Augusto
9	26	21 (80,7)		4 (15,3)	1 (3,8)	Santo Augusto
10	22	10 (45,4)		3 (13,6)	9 (40,9)	Santo Augusto
11	32	22 (68,7)		6 (18,7)	4 (12,5)	Chiapetta
12	17	6 (35,2)		2 (11,7)	9 (52,9)	Uruguaiana
13	17	4 (23,5)		3 (17,6)	10 (58,8)	Uruguaiana
14	5	3 (60,0)		1 (20,0)	1 (20,0)	Uruguaiana
15	4	2 (50,0)		0	2 (50,0)	Uruguaiana
16	5	5 (100,0)		0	0	Uruguaiana
17	13	2 (15,3)		4 (30,7)	7 (53,8)	Passo Fundo
18	4	1 (25,0)		0	3 (75,0)	Porto Lucena
19	31	8 (25,8)		1 (3,2)	22 (70,9)	Serafina Correa
20	25	0		0	25 (100,0)	Campina das Missões
21	64	21 (32,8)		9 (14,0)	34 (53,1)	Campina das Missões
22	12	4 (33,3)		3 (25,0)	5 (41,6)	Campina das Missões
23	23	13 (56,5)		5 (21,7)	5 (21,7)	Tapera
24	280	165 (58,9)		49 (17,5)	66 (23,5)	Horizontina
25	22	4 (18,1)		8 (36,3)	10 (45,4)	Tenente Portela
26	12	7 (58,3)		2 (16,6)	3 (25,0)	Gravatá
27	6	2 (33,3)		3 (50,0)	1 (16,6)	Alecrim
28	11	3 (27,2)		1 (9,0)	7 (63,6)	Santo Cristo
29	102	34 (33,3)		14 (13,7)	54 (52,9)	Camaquã
30	11	10 (90,9)		0	1 (9,0)	Pelotas
31	26	17 (65,3)		7 (26,9)	2 (7,6)	André da Rocha
32	17	5 (29,4)		4 (23,5)	8 (47,0)	Coxilha
33	20	6 (30,0)		6 (30,0)	8 (40,0)	Ernestina
34	13	11 (84,6)		1 (7,6)	1 (7,6)	Vianópolis
35	12	6 (50,0)		2 (16,6)	4 (33,3)	Vianópolis
36	314	125 (39,8)		47 (14,9)	142 (45,2)	Capela de Santana
Total	1316	588 (44,6)		209 (15,8)	519 (39,4)	

P= positivo

S= suspeito

N= negativo

O teste de ELISA detectou reagentes em 588 bovinos (44,6%) das 1316 amostras de soro testadas para a detecção de anticorpos contra o Map.

4. DISCUSSÃO

Os dados obtidos em nosso trabalho são superiores aos obtidos por FERREIRA et al. (2001) que estimaram a prevalência da infecção em 18%, utilizando o kit australiano; foram semelhantes às estimativas de 39% obtidas por LARANJA DA FONSECA et al. (2001), em São Paulo, e inferiores as estimativas de 65% obtidas por RIVERA (1996), em Mato Grosso, de um pequeno número de rebanhos do estado de São Paulo. A importância dos dados obtidos em nosso trabalho está alicerçada, principalmente por ser o nosso estado fronteiro a dois países com problemas sanitários semelhantes e com comércio regular envolvendo, principalmente a compra de bovinos leiteiros.

O teste detectou a presença da infecção em 35 rebanhos (97,2%) dos 36 amostrados. A infecção foi alta e a razão para tal fato pode ter sido a falta de diagnóstico clínico em animais com a forma clínica da doença e, principalmente pela inexistência de qualquer programa de controle da enfermidade. Nossos dados são superiores aos 60% obtidos por BRETT na Nova Zelândia, aos 51% e 55% obtidos por KALIS e MUSKENS na Holanda 55% e aos 50% obtidos por COLLINS no estado de Wisconsin.

A infecção foi identificada em todos os 25 municípios amostrados de diferentes regiões do Rio Grande do Sul semelhantemente aos obtidos no trabalho de FERREIRA et al. (2001), no Rio de Janeiro, que obtiveram presença da infecção em todos os 17 municípios amostrados.

5. CONCLUSÃO

A infecção causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* presente na grande maioria dos rebanhos leiteiros testados do Estado do Rio Grande do Sul.

VI CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro trabalho foi um estudo epidemiológico descritivo caracterizado pelo relato clínico de animais com paratuberculose bovina, tendo como base a anamnese, a apresentação e os sinais clínicos apresentados por um grupo de animais, além da descrição das alterações anatomopatológicas típicas desta enfermidade em um único rebanho leiteiro.

No segundo trabalho foi o prosseguimento do estudo epidemiológico descritivo com o isolamento do agente etiológico da doença de Johne e a aplicação do estudo epidemiológico analítico com a quantificação da infecção em uma única propriedade infectada através do teste de IDGA e ELISA.

O terceiro trabalho é um estudo epidemiológico analítico transversal ou estudo seccional da prevalência aplicado a rebanhos de vacas leiteiras, distribuídos em diferentes municípios do Estado.

Os dados epidemiológicos obtidos em nossos estudos são altos e bem maiores que os dados publicados pela literatura mundial, motivado principalmente pela falta de conhecimento e na ausência da aplicação de medidas de controle contra a doença ou infecção.

Há um imenso campo de pesquisa no estudo da paratuberculose dos animais domésticos, além da identificação de novas relações entre o agente, o hospedeiro e o ambiente.

No Brasil, não há programa de controle oficial. Algumas propriedades têm mostrado interesse, mas ele é voluntário e limitado a um pequeno número de rebanhos, em que na sua abrangência, ela é, essencialmente ineficaz, no controle desta enfermidade. Temos uma tendência a pensar que a doença de Johne é uma doença de bovinos, ignorando outras categorias animais. Doença de Johne não é uma doença limitada a bovinos; ela causa problemas em ovinos, caprinos, animais silvestre, exóticos e ainda risco a Saúde Pública.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, B.; RIEMANN, H.P. & HIRD, D.W. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and a note of its economic significance. *California Veterinarian*, v. 37, p. 2024, 1983a.
- ABBAS, B.; RIEMANN, H.P. & LONNERDAL, B. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, p. 2229-2236, 1983b.
- ABEL, L.; SANHEZ, F.O.; OBERTI, J.; THUC, N.V.; HOA, L.V.; LAP, V.D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P.H. & SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *Journal of Infectious Diseases*, v. 177, p. 133-145, 1998.
- ALIBASOGLU, M.; DUNNE, H.W. & GUSS, S.B. Naturally occurring arteriosclerosis in cattle infected with Johne's disease. *American Journal of Veterinary Research*, v. 23, p. 49-57, 1962.
- ANGER, D. Essai de traitement de la paratuberculose par le rimifon. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 132, p. 306-307, 1956.
- ANGUS, K.W. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 103, p. 101-105, 1990.
- APPLEBY, E.C. & HEAD, K.W. A case of suspected Johne's disease in a llama (*L. glama*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 64, p. 52-53, 1954.
- ARNOLDI, J.M.; HURLEY, S.S. & LESAR, S. Johne's disease in Wisconsin cattle. *Veterinary Laboratory Diagnostic Investigation*, v. 2, p. 493-496, 1983.
- ARONSON, T.; HOLTZMAN, A.; GLOVER, N.; BOIAN, M.; FROMAN, S.; BERLIN, O.G.; HILL, H. & STELMA, G. Jr Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates from potable water. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1008-1012, 1990.
- BARCLAY, R. & RATLEDGE, C. Iron binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *Journal of Bacteriology*, v. 153, p. 1138-1146, 1983 apud JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 12, p. 735-740, 1997a.
- BARCLAY, R. The role of iron in infection. *Medical Laboratory Science*, v. 42, p. 166-177, 1985 apud IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 12, p. 735-740, 1997a.
- BEARD, P.; HENDERSON, D.; DANIELS, M.J.; PIRIE, A.A.; BUXTON, D.; GREIG, A.; HUTCHINGS, M.R.; MCKENDRICK, I.; RHIND, S.; STENVENSON, K. & SHARP, J.M. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *The Veterinary Record*, v. 145, p. 612-613, 2000.
- BEERWERTH, W. Culture of mycobacteria from feces of domestic animals and their significance for the epidemiology of tuberculosis *Praxis Pneumology*, v. 21, p. 189-202, 1967 apud NIELSEN, S.S.; NIELSEN, K.K.; HUDA, A.; CONDRON, R. & COLLINS, M.T. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bulletin of the International Dairy Federation* nº 362/2001, 13p. 2001.

- BELKNAP, E.B.; GETZY, D.M.; JOHNSON, L.W.; ELLIS, R.P.; THOMPSON, G.L & SHULAW, W.P. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 204, p. 1805-1808, 1992.
- BELLOLI, A.; ARRIGONI, N.; BELLETTI, G.L.; PROVERBIO, D.; GREPPI, G. & VACIRCA, G. First results of paratuberculosis therapy in calves experimentally infected by intravenous route. In: *Proceedings of 4th International Colloquium On Paratuberculosis* International Association for Paratuberculosis, Cambridge, UK, p.144-146, 1994.
- BELLOLI, A.; CARLI, S.; PRAVETTONI, D.; PROVERBIO, D.; GIANGASPER, M.; LAUZI, S. & BONIZZI, L. Case study – Attempted treatment of a cow with *Mycobacterium paratuberculosis* enterocolitis. *The Bovine Practitioner*, v. 35, n.1, p. 56-60, 2001.
- BENDIXEN, P.H. Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal Veterinary Research*, v. 38, p. 1161-1162, 1977a.
- BENDIXEN, P.H. Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle from a *Mycobacterium paratuberculosis*-infected herd. *American Journal Veterinary Research*, v. 38, p. 2027-2028, 1977b.
- BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A. & STELWAGEN, J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *The Veterinary Record*, v. 121, p. 142-146, 1987.
- BILLMAN-JACOB, H.; CARRIGAN, M.; COCKRAM, F.; CORNER, L.A. GILL, I.J.; HILL, J.F. WOOD, P.R. A comparison of the interferon gamma assay with absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 69, p. 25-28, 1992.
- BOELAERT, F. WALRAVENS, K.; VERMEERSCH, J.P.; RASKIN, A.; DUFÉY, J. & GODFROID, J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. In: *Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Australia, p.76-88, 1999.
- BOEVER, W.J. & PETERS, D. Paratuberculosis in two herds of exotic sheep. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 165, p. 822-823, 1974
- BOLSKE, G.; VISKE, D.; LARSSON, B. & STERNBERG, S. Use of culture and serology in tracing and screening for paratuberculosis in Swedish cattle. In: *Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*, International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, p. 52, 1999.
- BRAUN, R.K.; BUERGELT, C.D.; LITTELL, R.C.; LINDA, S.B. & SIMPSON, J.R. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.196, p. 1251-1254, 1990.
- BREES, D.J.; REIMER, S.B.; CHEVILLE, N.F.; FLORANCE, A. & THOEN, C.O. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, p. 60-63, 2000.
- BRETT, E. Johne's disease: an economic evaluation of control options for the New Zealand livestock industries. Agriculture, New Zealand, Wellington. 73p, 1998 *apud* KENNEDY, D.J. & BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épidémiologies*, v. 20, n.1, p. 151-179, 2001.

- BROOKS, B.; ROBERTSON, R.; CORNER, A.; SAMAGH, B.; GARCIA, M.; TURCOTTE, C. & DUNCAN, J. Evaluation of the serological response of sheep in one flock to *Mycobacterium paratuberculosis* by crossed immunoelectrophoresis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 199-204, 1988.
- BROTHERSTON, J.G.; GILMOUR, N.J.L.; SAMUEL, J.M. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. I Routes of infection and assay of viable *M. johnei*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 71, p. 286-299, 1961a.
- BROTHERSTON, J.G.; GILMOUR, N.J.L.; SAMUEL, J.M. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. II. Protection afforded by dead vaccines. *Journal of Comparative Pathology*, v. 71, p. 300-310, 1961b.
- BRUNELLO, F.; PERA, A.; MARTINI, S.; MARINO, S.; ASTEGIANO, M.; BARLETTI, C.; GASTALDI, P.; VERME, G.; EMANUELLI, G. Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. *Digestive Disease Science*, v. 36, p.1741-1745, 1991.
- BRYANT, J.L.; HANNER, T.L.; FULTZ, D.G.; HURLEY, S.L. & BESCH-WILLIFORD, C. A chronic granulomatous intestinal disease in ferrets caused by an acid-fast organism morphologically similar to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Laboratory Animal Science*, v. 38, p. 498-499, 1988.
- BUERGELT, C.D.; HALL, C.E.; MERKAL, R.S.; WHITLOCK, R.H. & DUNCAN, J.R. Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. *American Journal Veterinary Research*, v. 38, p. 1709-1715, 1977.
- BUERGELT, C.D. & DUNCAN, J.R.D. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 173, p. 478-480, 1978.
- BUERGELT, C.D.; HALL, C.; McENTEE, K. & DUNCAN, J.R. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Veterinary Pathology*, v. 15, p. 196-207, 1978.
- BUERGELT, C.D.; LAYSON, A .W.; GINN, P.E.; TAYLOR, M.; KING, J.M.; HAEBECKER, P.L.; MAULDIN, E.; WHITLOCK, D.; ROSSITER, C. & COLLINS, M.T. The pathology of spontaneous paratuberculosis in North American bison (*Bison bison*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 37, p. 428-438, 2000.
- ÇETINKAYA, B. ERDOGAN, H.M. & MORGAN, K.L. Prevalence incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Veterinary Record*, v. 143, p. 265-269, 1998.
- CHIODINI, R.S. & VAN KRUININGEN, H.J. Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 182, p. 168-169, 1983.
- CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, v. 74, p. 218-262, 1984a.
- CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S.; THAYER, W.R.; COUTU, J.A. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 20, p. 966-971, 1984b.
- CHIODINI, R.J. & VAN KRUININGEN, H.J. The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell Veterinarian* v. 76, p. 91-104, 1986.

- CHIODINI, R.J. Bactericidal activities of various antimicrobial agents on human and animal isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 34, p. 366-367, 1989.
- CHIODINI, R.J. & DAVIS, W.C. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4⁺ activity. *Microbial Pathogenesis*, v. 13, p. 447-463, 1992.
- CHIODINI, R.J. & DAVIS, W.C. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4⁺ helper and CD8⁺ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta⁺ T-cell cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, v. 14, p. 355-367, 1993.
- CHIODINI, R.J. *The History of Paratuberculosis (Johne's disease) A review of the literature 1895 to 1992*. Chiodini Editor, 658 p. 1993.
- CHIODINI, R.J. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* Strain 18. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p. 1956-1957, 1993.
- 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.S. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice*, v.12, n. 2, p.313-343, 1996.
- CHIODINI R.J. & ROSSITER C.A. Paratuberculosis a potential zoonosis. *Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice* v.12, n.2, p.457-467, 1996.
- CHIODINI, R. Proposed change to the IAP adaptation of *Mycobacterium paratuberculosis* taxonomic classification *Paratuberculosis Newsletter*. v. 12, n. 2, p. 2-3, 2000.
- CLARKE, C.J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology*, v. 116, p. 217-261, 1997.
- COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; DE KESEL, M.; POUPART, P. & VANNUFFEL, P. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Review*, v. 7, p. 328-345, 1994.
- COETSIER, C.; HAVAUX, X.; MATTELARD, F.; SADATTE, S.; CORMONT, F.; BUERGELT, K.; LIMBOURG, B.; LATINNE, D.; BAZIN, H.; DENEFF, J-F. & COCITO, C. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, p. 446-451, 1998.
- COLGROVE G.S. & THOEN C.O. BLACKBURN B.O. & MURPHY C.D. 1989. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal cultures. *Veterinary Microbiology*, v. 19, p. 183-187, 1989.
- COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M. & De LISLE, G.W. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 51, p. 175-178, 1989.
- COLLINS, M.T.; KENEFICK, K.B.; SOCKETT, D.C.; LAMBRECHT, R.S.; McDONALD, J. & JORGENSEN, J.B. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 2514-2519, 1990.
- COLLINS, M.T. & MORGAN, I.R. Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 199, p. 1724-1729, 1991.

- COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M. & De LISLE, G.W. Comparison of polymerase chain reactions tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology*, v. 36, p. 289-299, 1993.
- COLLINS, M.T. & SOCKETT, D.C. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 203, n. 10, p. 1456-1463, 1993.
- CORPA, J.M.; GARCÍA MARÍN, J.F. & PÉREZ, V. Diagnóstico de paratuberculosis en ganado vacuno. *Medicina Veterinaria*, v. 15, p. 618-623, 1998.
- COLLINS, M.T. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 204, p. 2, 1994.
- COLLINS, M.T. Diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice* v. 12, p. 357-371, 1996.
- COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen ? *Journal of Dairy Science*, v.80, p.3445-3448, 1997.
- COLLINS, M.T.
- COLOE, P.J.; LIGHTFOOT, D. & FROMM, W. Comparison of the use of mycobactin J e mycobactin P for detection of Johne's disease in Australian dairy herds. In: *Proceeding of the 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*. Ames Iowa, USA, p. 71-76, 1983.
- DACORSO FILHO, P.; CAMPOS, I.O.N.; FARIA, J.F.; LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v. 3, p.129-139, 1960.
- DAVIS, B.D. Bacterial nutrition and growth In: *Microbiology*. 3^o ed. 1980, p. 59-70, 1980 *apud* JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n.12, p. 735-740, 1997.
- De KESEL, M.; GILOT, P.; COENE, M. & COCITO, C. Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 36, p. 201-212, 1992.
- De KESEL, M.; GILOT, P.; MISONNE, M.C.; COENE, M. & COCITO, C. Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 947-954, 1993.
- De LISLE, G.W.; SEGUIN, P.; SAMAGH, B.S.; CORNER, A.H. & DUNCAN, J.R. Bovine paratuberculosis. I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Canadian Journal Veterinary Research*, v. 44, p. 177-182, 1980a
- De LISLE, G.W.; SAMAGH, B.S. & DUNCAN, J.R. Bovine paratuberculosis. II A comparison of fecal culture and antibody response. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 44, p.183-191, 1980b.
- De LISLE, G.W. & MILESTONE, B.A. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: *Johne's disease. Current Trends in Research Diagnosis and Management*. Milner, A.R. & Wood, P.R. Eds, CSIRO. Melbourne, Australia p. 41-46, 1993.
- DEL PRETE, R.; QUARANTA, M.; LIPPOLIS, ^a; GIANNUZI, V.; MOSCA, A.; JIRILLO, E. & MIRAGLIOTTA, G. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in stool samples of patients with inflammatory bowel disease by IS900-based PCR

- and colorimetric detection of amplified DNA. *Journal of Microbiological Methods*, v. 33, p. 105-114, 1998.
- DESMECHT, M. La paratuberculose. Symptomatologie et facteurs favorisants. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v.119, p. 371-381, 1975.
- DIERCKINS, M.S.; SHERMAN, D.M. & GENDRON-FITZPATRICK, A. Presumptive paratuberculosis in a Sicilian ass. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 28, p. 459-461, 1990.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; COSTA, J.B.D. & DAYRELL, M.S. “Espichamento”, intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal de Mato Grosso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 6, p. 91-117, 1971.
- DOMINGO, M.; LIEBANA, E.; CARRERA, J.; VILAFRANCA, M.; CASAL, J.; ARANAZ, A.; ALTIMIRA, J.; VIDAL, D.; MARCO, A.; PLANELL, J.M.; MATEOS, A. & DOMINGUEZ, L. Eficacia comparative de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de gamma-interferon para el diagnóstico de la tuberculose bovina en una prueba de campo. *Medicina Veterinaria*, v. 12, p. 307-317, 1995.
- DOYLE, T.M. Vaccination against Johnhe’ s disease. *Veterinary Record*, v. 57, p.385-387, 1945.
- DOYLE, T. Johnhe’ s disease. *Veterinary Record*, v. 68, p. 869-886, 1956.
- DOYLE, T. Vaccination against Johnhe’ s disease. *Veterinary Record*, v. 76, p.73-77, 1964.
- DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F.; GOMES, M.J.P.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, n.3/4, p.109-115, 1999.
- DUKES, T.W.; GLOVER, G.J.; BROOKS, B.W.; DUNCAN, J.R. & SWENDROWSKI, M. Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 28, p. 161-170, 1992.
- DUMONCEAU, J.M.; VAN GOSSUM, A.; ADLER, M.; FONTEYNE, P.A.; VAN VOOREN, J.P.; DEVIERE, J.; PORTAELS, F. No *Mycobacterium paratuberculosis* found in Crohn’ s disease using polymerase chain reaction. *Digestive Disease Science*, v. 41, p.421-426, 1996.
- DUPONT, O. Nota do Jornal do Comercio de 5 de novembro p. 8, 1915.
- ELSAGHIER, A.; PRANTERA, C.; MORENO, C.; IVANYI, J. Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*-specific protein antigens in Crohn’ s disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v.90, p.503-508, 1992.
- FERREIRA, R.; FONSECA, L. & 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. 166-171, 2001.
- FISS, E.H.; YU, S. & JACOBS, W.R. Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Molecular Microbiology*, v. 14, p. 557-569, 1994 apud JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n.12, p. 735-740, 1997a.
- FLEISS, J.L. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2ª Edição, John Wiley & Sons New York, 321p. 1981.
- FOLLETT, D.M. & CZUPRYNSKI, C.J. Ciclophosphamide and prednisolone exarcebate the severity of intestinal paratuberculosis in *Mycobacterium paratuberculosis*

- monoassociated mice. *Microbiology Pathology*, v. 9, p. 407-415, 1990.
- FRANCIS, J.; MACTURK, H.M.; MADINAVEITIA, J. & SNOW, G.A. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. 1. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochemistry Journal*, v. 55, p. 596-607, 1953.
- FRANCOIS, B.; KRISHNAMOORTHY, R. & ELION, J. Comparative study of *Mycobacterium paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Epidemiology Infections*, v. 118, p. 227-233, 1997.
- GASTEINER, J.; WENZL, H.; FUCHS, K.; JARK, U. & BAUMGARTNER, W. Serological Cross-sectional Study of paratuberculosis in Cattle in Austria. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.46, p. 457-466, 1999.
- GEISEL, O.; NETTER, F. & HERMANN, W. Specificity of immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 41, p. 548-553, 1994.
- GILMOUR, N.J.L.; NISBET, D.I. & BROTHERSTON, J.G. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 75, p. 281-286, 1965.
- GILMOUR, N.J.L. & BROTHERSTON, J.G. Further studies on immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. Relationship between hypersensitivity and host response to infection. *Journal of Comparative Pathology*, v. 76, p. 341-349, 1966.
- GILMOUR, N.J.L. & GOUDSWAARD, J. *Corynebacterium renale* as a cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease. *Journal of Comparative Pathology*, v. 82, p. 333-336, 1972.
- GILMOUR, N.J.L. The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Veterinary Record*, v. 99, p. 433-434, 1976.
- GILMOUR, N.J.L.; ANGUS, K.W. & MITCHELL, B. Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 2, p. 223-235, 1978.
- GILOT, P. & MISONNE, M. *Mycobacterium paratuberculosis* and *Escherichia coli* share common antigenic determinants. *Veterinary Microbiology*, v. 39, p. 353-360, 1994.
- GOMES, M.S. & APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology*, v. 95, p. 165-168, 1998.
- GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; SOARES, D.G.; BRITES, M.G.; LANZON, L.F. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e, sua infecção em rebanho leiteiro no RS. In: *IV Congresso Brasileiro de Buiatria*, 2001, Campo Grande, MS, 2001.
- GOMES, M.J.P. Paratuberculose bovina: um grande desafio sanitário brasileiro. *Minas de Leite*, Ano III, n. 24, p.19-21, 2002a.
- GOMES, M.J.P. A doença de Johne ou paratuberculose bovina no Brasil. In: *Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária*, 2., Ruminantes, Anais, Rio de Janeiro, p. 1-6, 2002b,
- GOUDSWAARD, J.; GILMOUR, N.J.L.; DIJKSTRA, R.G. & VAN BEEK, J.J. Diagnosis of Johne's disease in cattle: A comparison of five serological tests under field conditions. *Veterinary Record*, v. 98, p. 461-462, 1976.

- GRAHAM, D.Y.; MARKESICH, D.C.; YOSHIMURA, H.H. Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology*, v. 92, p. 436-442, 1987.
- GRANT, I.R.; BALL, H.J.; NEILL, S.D. & ROWE, M.T. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's 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. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 26, p.166-170, 1998.
- GRANT, I.R.; HITCHINGS, E.I.; McCARTNEY, A.; FERGUSON, F. & ROWE, M.T. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 602-607, 2002a.
- GRANT, I.R.; BALL, H.J. & ROWE, M.T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercial pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 5, p. 2428-2435, 2002b.
- GREEN, E.P.; TIZARD, M.L.; MOSS, M.T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D.J.; McFADDEN, J.J. & HERMON-TAYLOR, J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, v. 17, p. 9063-9073, 1989.
- GREIG, A.; STEVENSON, K.; PEREZ, V.; PIRIE, A.A.; GRANT, J.M. & SHARP, J.M. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Record*, v. 140, p. 141-143, 1997.
- GREIG, A.; STEVENSON, K.; HENDERSON, D.; PEREZ, V.; HUGHES, V.; PAVLIK, I. HINES, M.E. II.; McKENDRICK, I. & SHARP, J.M. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1746-1751, 1999.
- GUNNARSSON, E. & FODSTAD, F.H. Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 20, p. 122-134, 1979.
- HAGAN, W.A. Vaccination against Johne's disease. *Cornell Veterinarian*, v. 25, p. 344-353, 1935.
- HAMILTON, H.L.; COOLEY, A.J.; ADAMS, J.L. & CZUPRYNSKI, C.J. *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated need mice as a paratuberculosis model. *Veterinary Pathology*, v.28, p. 146-155, 1991.
- HAMILTON, H.L.; FOLLETT, D.M.; SIEGFRIED, L.M. & CZUPRYNSKI, C.J. Intestinal multiplication of *Mycobacterium paratuberculosis* in athymic nude gnotobiotic mice. *Infections and Immunity*, v.57, p. 225-230, 1989.
- HARRIS, J.E. & LAMMERDING, A.M. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Current issues. *Journal of Food Protection*, v. 64, p. 2103-2110, 2001.
- HOPE, A.F.; TULK, P.A. & CONDRON, R.J. Pasteurization of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. In: *Proceedings of 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Cambridge, UK, p. 377-382, 1996.

- HERMON-TAYLOR, J.; MOSS, M.; TIZARD, M.; MALIK, Z. & SANDERSON, J. Molecular biology of Crohn's disease mycobacteria. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, v. 4, p. 23-42, 1990.
- HERMON-TAYLOR, J. TIZARD, M.; SANDERSON, J.; KEMPESELL, K.; SUMAR, N.; MILAR, D.; LOUGHLIN, M.; FORD, J. & WITHEY, S. Mycobacteria and the aetiology of Crohn's disease. In: *Inflammatory Bowel Diseases*. Rachmilewitz, D. (Ed.) Londres, Kluwer Academic Publishers, p. 51-57, 1994.
- HERMON-TAYLOR, J.; BARNES, N.; FINLAYSON, C. *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *British Medical Journal*, v. 316, p. 449-453, 1998.
- HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the causation of Crohn's disease. *Paratuberculosis Newsletter*, v.12, p. 57-60, 2000.
- HERMON-TAYLOR, J.; BULL, T.J.; SHERIDAN, J.M.; CHENG, J.; STELLAKIS, M.L. & SUMAR, N. The causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Canadian Journal of Gastroenterology*, v. 14, p. 521-539, 2000,
- HILBINK, F. WEST, D.M. DE LISLE, G.W. KITTELBERGER, R. HOSIC, B.D. HUITEMA, H. Johne's disease in cattle and vaccination. *Office International d'Epizootie*, v. 68, p. 743-748, 1967.
- HILLERMARK, K. A disease resembling paratuberculosis (Johne's disease) in roe deer (*Capreolus capreolus* L.), *Acta Veterinaria Scandinavica.*, v. 7, p. 330-363, 1966.
- HUCKZERMEYER, H.F.A.K.; BRÜCKNER, G.K. & BASTIANELLO, S.S. Paratuberculosis. In: *Infectious Disease of Livestock with special Reference to Southern Africa* Coetzer, J.A.W., Thompson G.R. & Tustin R.C. (Ed), Vol.2. Oxford University Press, Cape Town, p. 1445-1457, 1994.
- HUTCHINSON, L.J. Economic impact of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 12, n.2, p. 373-381, 1996.
- HINES, M.E.; BUERGELT, C.D.; WILSON, J.H. & BLISS, E.L. Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 190, p. 681-683, 1987.
- HURLEY, S.S.; SPLITTER, G.A. & WELCH, R.A. Development of a diagnostic test for Johne's disease using a DNA hybridization probe. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, p. 1582-1587, 1989.
- HUTTON, J. COOKE, M.M. & PENROSE, M. Comparison of a Complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISA for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 41, p.107-116, 1994.
- JANSEN, J. Paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 112, p. 52-55, 1951.
- JESSUP, D.A.; ABBAS, B.; BEHYMER, D. & GOGAN, P. Paratuberculosis in tule elk in California. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 179, p.1252-1254, 1981.
- JESSUP, D.A. & WILLIAMS, E. Paratuberculosis in free-ranging wildlife in North America In: *Zoo and Wild Animal Medicine - Current Therapy*. Fowler, M.E. & Miller, R.E. (Eds) W.B. Saunders, Philadelphia, p. 616-620, 1990.
- JOHNSON, H.W. Studies on johnin: V. Producing and standardizing a potent product. *American Journal Veterinary Research*, v.5, p. 320-328, 1944.

- JORGE, M.C.; CATENA, M.; CABODEVILA, J. & SOTO, P. Micobacterias em sêmen bovino criopreservado. *Veterinaria Argentina*, v. 15, n. 145, p. 337-340, 1998.
- JØRGENSEN, J.B. & JENSEN, P.T. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 19, p. 310-312, 1978.
- JØRGENSEN, J.B. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 23, p. 325-335, 1982.
- JØRGENSEN, J.B. Diagnosis of clinical and non clinical paratuberculosis by immunological and bacteriological methods. *Proceeding of the 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*. Ames, Iowa, USA, p. 136-144, 1983.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J.B. & SPRECHER, D.J. The effect of subclinical Johne's disease on reproductive outcomes in dairy cattle: some preliminary results. *In: Proceedings of 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA, p. 147-150, 1996.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 12, p. 735-740, 1997a.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Epidemiologic and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Veterinary Bulletin*, v. 67, p. 437-447, 1997b.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Management-related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 37, p. 41-54, 1998.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J.B. & LLOYD, J.W. Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 214, p. 822-825, 1999a.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *American Journal of Veterinary Research*, v. 60, p. 589-596, 1999b.
- JONES, R.L. Review of the economic impact of Johne's disease in the United States. *In: Johne's disease. Current Trends in Research Diagnosis and Management*. Milner, A.R. & Wood, P.R. Eds, CSIRO. Melbourne, Australia p. 46-50, 1989 *apud* KENNEDY, D.J. & BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties*, v. 20, n.1, p. 151-179, 2001.
- JONES, P.H. Bovine paratuberculosis: ongoing challenges, renewed concerns. *In Practice*, v. 7/8, p. 402-411, 2001.
- JUSTE, R.A.; OCARIZ, C.S. de.; MARCO, J.C. & BADIOLA, J.J. Diagnosis of clinical paratuberculosis in sheep: a comparison of pathological, bacteriological and serological methods. *In: Proceeding of 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. Paris, França, p. 220-226, 1988.
- JUSTE, R.A. & ADÚRIZ, J.J. Diagnóstico *In: Paratuberculosis ovina*. Ovis. Luzán S.A. de Ediciones, Madrid, Espanha, p. 77-85. 1990.
- JUSTE, R. Johne's disease: A review of current knowledge. *In: Proceedings of 4th International Congress of Sheep Veterinarians*. Australian Sheep Veterinary Society. Armindale, New South Wales, Austrália, p. 140-150, 1997.

- KALIS, C.H.J.; BARKEMA, H.W. & HESSELINK, J.W. Certification of Dairy herds as free of paratuberculosis using culture of strategically pooled fecal samples. *In: Proc. 6th Intl. Colloq. On Paratuberculosis*. Melbourne, Australia, IAP, p. 55-58, 1999a.
- KALIS, C.H.J.; HESSELINK, J.W.; RUSSCHEN, E.W.; BARKEMA, W.; COLLINS, M.T. & VISSER, L.J.R. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 345-351, 1999b.
- KALIS, C.H.J.; HESSELINK, J.W. & BARKEMA, H.W. Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Australia, p. 344-348, 1999c.
- KATIC, I. Paratuberculosis (Johne's disease) with special reference to captive wild animals. *Noordisk Veterinaermedizin*, v. 13, p. 205-214, 1961. *apud* WILLIAMS, E.S.; SPRAKER, T.R. & SCHOONVELD, G.G. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and Rocky Mountain goat in Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 15, p. 221-227, 1979.
- KESWANI, J. & FRANK, J.F. Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 974-978, 1998.
- KENNEDY, D.J. & BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, v. 20, n.1, p. 151-179, 2001.
- KIM, S.G.; SHIN, S.J.; JACOBSON, R.H.; MILLER, L.J.; HARPENDING, P.R.; STEHMAN, S.M.; ROSSITER, C. A. & LEIN, D.A. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 126-131, 2002.
- KITT, T. *Lehrbuch der Pathologischen Anatomie der Haustiere*. Vol. 3. 5. Aufl. Ferdinand Enke, Stuttgart. 695 p. 1927.
- KOENING, G.J.; HOFFIS, G.F.; SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; RINGS, M. & St-JEAN, G. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues blood and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *American Journal Veterinary Research*, v. 54, p. 1441-1445, 1993.
- KOETS, A.P.; ADUGNA, G.; JANSSE, L.G.; VAN WEERING, H.J.; KALIS, C.H.J.; HARBERS, A.; RUTTEN, V.P.M.G. & SCHUKKEN, Y.H. Genetic variation in susceptibility to *M. a. paratuberculosis* infection in cattle. *In: Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Australia, p. 169-175, 1999.
- KOETS, A.P. Patterns of T-cell responses in different stages of bovine paratuberculosis. PhD Thesis. Graduate School Animal Health (GSAH), Utrecht, Netherlands 135p. 2000.
- KOPECKY, K.E. Distribution of bovine paratuberculosis in the US. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 162, p. 787-788, 1973.
- KOPECKY, K.E. Distribution of paratuberculosis in Wisconsin, by soil regions. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.170, p. 320-324, 1977.

- KÖRMENDY, B. Diagnostic value of mamalian, avian and johnin PPD tuberculin in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Veterinária Hungarica*, v. 36, p. 177-183, 1988.
- KÖRMENDY, B. Paratuberculosis in a cattle herd: comparison of allergic, serologic and faecal micorscopic tests. *Acta Microbiológica Hungarica*, v. 37, p. 219-222, 1990.
- KREEGER, J.M. Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustration. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 3, p. 373-383, 1991.
- LAGADIC, M.; LE MENEZ, M.; ARGENTE, G.; LECOZ, N.; MASSARD, M.T.; MOISAN, J. & QUINIOU, M.A. Technique s de cultures de *Mycobacterium paratuberculosis*: Leur utilization en routine dans un laboratoire de diagnostic. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 159, p. 801-807, 1983.
- LAMBRECHT, R.S. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*: factors that influence mycobactin dependence. *Diagnosis in Microbiology and Infections Diseases*, v. 15, p. 239-246, 1992.
- LARANJA DA FONSECA, L.F.; PEREIRA, C.C. Paratuberculose ou doença de Johne: cuidado ! *Balde Branco*. Ano 34, n. 404, p. 45-47, 1998.
- LARANJA DA FONSECA, L.F.; OLIVAL, A.A.; PEREIRA, C.C.; HEINEMANN, M.B.; RICHTZENHAIN, L.J.; SANTOS, M.V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Vetinária da UFRGS*, v. 28, n.1, p. 51-60, 2000.
- LARSEN, A.B. & GROTH, A.H. Johne' s disease in the United States. *Veterinary Medicine of Small Animal Clinics*, v. 44, p. 294-295, 1949.
- LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H. & GROTH, A.H. Preliminary studies on the effects of streptomycin and other agents on *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 11, p. 374-377, 1950.
- LARSEN, A.B. Experiment on vaccination against Johne' s disease. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.117, p. 106, 1950.
- LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S. & VARDAMAN, T.H.; Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 17, p. 549-551, 1956.
- LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; MERKAL, R.S. An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne' s disease. I. The significance of the intradermal johnin test. *American Journal of Veterinary Research*, v.24, p.91-93, 1963a.
- LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; MERKAL, R.S. An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne' s disease. II. The significance of Complement-fixation test. *American Journal of Veterinary Research*, v. 24, p. 948-950, 1963b.
- LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; MERKAL, R.S. An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne' s disease: The significance of the hemagglutination test. *American Journal of Veterinary Research*, v. 26, p. 254-257, 1965.
- LARSEN A.B.; MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; MOON, H.W. Hypersensitivity and serologic responses in cattle vaccinated with disrupted *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently infected with *Mycobacterium bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 30, p. 2167-2172, 1969.
- LARSEN, A.B. & KOPECKY, K.E. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*, v. 31, p. 255-258, 1970.

- LARSEN, A.B. Paratuberculosis: the status of our knowledge. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 161, p. 1539-1541, 1972.
- LARSEN, A.B. Johne's disease - immunization and diagnosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 163, p. 902-904, 1973.
- LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S.; MOON, H.W. Evaluation of a paratuberculosis vaccine given to calves before infection. *American Journal of Veterinary Research*, v. 35, p. 367-369, 1974.
- 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. 36, p. 255-257, 1975
- LARSEN A.B.; MOYLE, A.I.; HIMES, E.M. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *American Journal of Veterinary Research*, v. 39, p. 65-69, 1978.
- LARSEN, A.B. & MILLER, J.M. Mammary gland exposure of cows to *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 40, p. 1657-1658, 1978.
- LARSEN, A.B.; STALHEIM, O.H.V.; HUGHES, D.E.; APPELL, L.H.; RICHARDS, W.D. & HIMES, E.M. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 179, p. 169-171, 1981.
- LEPPER, A.B.; EMBURRY, D.H.; ANDERSON, D.A.; LEWIS, V.M. Effects of altered dietary iron intake in *Mycobacterium paratuberculosis*-infected dairy cattle: sequential observations on growth, iron and copper metabolism and development of paratuberculosis. *Research in Veterinary Science*, v. 46, p. 289-296, 1989a.
- LEPPER, A.B.; WILKS, C.R.; KOTIW, M.; WHITEHEAD, J.T.; SWART, K.S. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody response of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal and high iron intake. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, p. 50-55, 1989b.
- LISBY, G.; ANDERSEN, J.; ENGBAER, K.; BINDER, V. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 29, p. 923-929, 1994.
- LISLE & WALL, 1983
- LOVELL, R.; LEVI, M. & FRANCIS, J. Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology*, v. 54, p. 120-129, 1944.
- MACINDOE, R.H.F. What can we do about Johne's disease? *Australian Veterinary Journal*, v. 26, p. 216-220, 1950.
- MACKINTOSH, C.G.; QURESHI, T.; WALDRUP, K.; LABES, R.E.; DODDS, K.G. & GRIFFIN, J.F. Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infections and Immunity*, v. 68, p. 1620-1625, 2000.
- MANNING, E.J.B. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties*, v. 20, p.133-150, 2001
- MASSONE, A.R.; MARTIN, A.A.; IBARGOYEN, G.S. & GIMENO, E.J. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 37, p. 251-253, 1990.

- McCLURE, H.M.; CHIODINI, R.J.; ANDERSON, D.C.; SWENSON, R.B.; THAYER, W.R. & COOK, J.A. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump tail macaques (*Macaca arctoides*). *Journal of Infectious Diseases*, v. 155, p. 1011-1019, 1987.
- McDONALD, J.M.; COLLINS, M.T. & LAMBRECHT, R.S. Radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* from clinical specimens. In: *Johne's disease: Current Trends in Research, Diagnosis and Management*. Eds A. Milner & Wood, P. CSIRO, Melbourne, Australia p.146-152, 1989.
- McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F. & CONDRON, R.J. Evaluation of diagnostics tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 77, p. 113-119, 1999.
- McFADDEN, J.J.; BUTCHER, P.D.; CHIODINI, R.; HERMON-TAYLOR, J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, p. 796-801, 1987.
- McFADDEN, J.J. & HOUDAYER, C. No evidence for antibodies to mycobacterial A60 antigen in Crohn's disease sera by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) *Journal of Medical Microbiology*, v. 25, p. 295-298, 1988.
- McFADDEN, J.J.; COLLINS, J.; BEAMAN, B.; ARTHUR, M.; GITNICK, G. Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 3070-3073, 1992.
- McKENZIE, R.A. & WARD, W.H. *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: a possible cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease of cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 57, p. 200-201, 1981. et al. 1981
- McNAB, W. B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; MARTIN, S.W. & VAN DREUMEL, A.A. An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 246-251, 1991a.
- McNAB, W. B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W. & DUNCAN, J.R. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 356-361, 1991b.
- MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B. & THURSTON, J.R. Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal Veterinary Research*, v. 25, p. 1290-1293, 1964.
- MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; KOPECKY, K.E. & NESS, R.D. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *American Journal Veterinary Research*, v. 29, p. 1533-1538, 1968.
- MERKAL, R.S. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). *Proceedings of U.S. Animal Health Association*, v. 74, p. 620-623, 1970.
- MERKAL, R.S. & RICHARDS, W.D. Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. *Applied Microbiology*, v. 24, p. 205-207, 1972.
- MERKAL, R.S. Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 163, p. 1100-1102, 1973.
- MERKAL, R.S. & LARSEN, A.B. Clofazimine treatment of a cow naturally infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal Veterinary Research*, v. 34, n.1, p. 27-28, 1973.

- MERKAL, R.S. & WITZEL, D.A. Passive transfer of johnin hypersensitivity with reactivity resembling clinical paratuberculosis in calves. *Infections and Immunity*, v. 7, p.196-198, 1973.
- MERKAL, R.S. & CURRAN, B.J. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology*, v. 28, p. 276-279, 1974.
- MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B. & BOOTH, G.D. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 36, p. 837-838, 1975.
- MERKAL, R.S. & McCULLOUGH, W.G. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiology*, v.7, p. 333-335, 1982.
- MERKAL, R.S. MILLER, J.M.; HINTZ, A.M. & BRYNER, J.H. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, p. 676-678, 1982.
- MERKAL, R.S. Report on the *Proceedings of 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*. Ames, Iowa, USA, p. 446, 1983 *apud* KENNEDY, D.J. & BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v. 20, n.1, p. 151-179, 2001.
- MERKAL, R.S. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 184, 939-943, 1984.
- MERKAL, R.S.; LYLE, P.A.S. & WHIPPLE, D.L. Decontamination, media, and culture methods for *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *Proceeding of U.S. Animal Health Association*, v. 89, p. 519-522, 1985.
- MERKAL, R.S.; WHIPPLE, D.L.; SACKS, J.M. & SNYDER, G.R. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 190, p. 676-680, 1987.
- MEYLAN, M.; RINGS, M.; SHULAW, W.P.; KOWALSKI, J.J.; BECH-NIELSEN, S. & HOFFSIS, G.F. 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.; FORD, J.; SANDERSON, J.; WITHEY, S.; TIZARD, M.; DORAN, T. & HERMON-TAYLOR IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p. 3446-3452, 1996.
- MILNER, A.R.; WILKS, C.R. & BORLAND, R. In vitro responses of lymphocytes from cattle with advanced *Mycobacterium paratuberculosis* infection to homologous and heterologous antigens. *Research in Veterinary Science*, v. 31, p. 93-99, 1981,
- MILNER, A.R.; MACK, W.N. & COATES, K.J. A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, p. 305-306, 1989.
- MILNER, A.R.; MACK, W.N.; COATES, K.J.; HILL, J.; GILL, I. & SHELDRIK, P. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of John's disease from a field trial in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 25, p. 193-198, 1990.
- MOMOTANI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B. & CHEVILLE, N.F. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into

- domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology*, v. 25, p. 131-137, 1988.
- MORGAN, I. Literature review of cross-species infections with *Mycobacterium paratuberculosis*. *The Paratuberculosis Newsletter*, v. 11, p. 8-24, 1999.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MOSS, M.T.; GREEN, E.P.; TIZARD, M.L.; MALIK, Z.P. & HERMON-TAYLOR, J. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridization with a fragment of the insertion element IS900. *Gut*, v. 32, p. 395-398, 1991.
- MOSS, M.T.; SANDERSON, J.D.; TIZARD, M.L.; HERMON-TAYLOR, J.; EL-ZAATARI, F.A. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut*, v. 33, p. 1209-1213, 1992.
- MOULIN, G.C. & STOTTMEIER, K.D. Use of Cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 36, p. 771-773, 1978.
- MUSKENS, J.; BARKEMA, H.W.; RUSSCHEN, E.; VAN MAANEN, K.; SCHUKKEN, Y.H. & BAKKER, D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. In: *Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Austrália, p. 207-212, 1999.
- NAKAJIMA, M.; MAIA, F.C.L.; MOTA, P.M.P.C. Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. In: *IV Simpósio Brasileiro em Micobactérias*, Bauru, São Paulo, Trabalho 67 1991.
- NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Johne's disease on U.S. dairy operations. Report N245.1087. USDA:APHIS:VS, CEAH National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, Colorado USA, 1997. *apud* MANNING, E.J.B. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties*, v. 20, p.133-150, 2001.
- NEILANDS, J.B. Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry*, v. 50, p. 715-731, 1981 *apud* JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 12, p. 735-740, 1997a.
- NGUYGEN, H.T. & BUERGELT, C.D. Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. *American Journal Veterinary Research*, v. 44, p. 2173-2174, 1983.
- NIELSEN, S.S. & AGGER, J.F. Prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. In: *Proceedings of 9th International Society of Veterinary Epidemiology and Economics*. Breckenridge, Colorado. Colorado State University, USA, 2000.
- NIELSEN, S.S.; THAMSBORG, S.M.; HOUE, H. & BITSCH, V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 44, p. 1-7, 2000.
- NIELSEN, S.S.; NIELSEN, K.K.; HUDA, A.; CONDRON, R. & COLLINS, M.T. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bulletin of the International Dairy Federation* n° 362/2001, 13p. 2001.

- NIELSEN, S.S. Paratuberculosis in Danish dairy cattle Interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage PhD thesis Epidemiology Department of Animal Science and Animal Health, The Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg, Denmark ,138p, 2002.
- NORRIS, M.J. & SPENCER, T.L. The efficacy of the complement fixation test for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. *In: Johnes disease. Current trends in Research diagnosis and management.* CSIRO publication. Australia, p. 153-157, 1990.
- OTT, S. L.; WELLS, S.J. & WAGNER, B.A. 1999. Herd-level economic losses associated with Johnes' s disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 40, p. 179-192, 1999.
- PAYNE, J.M. & RANKIN, J.D. The pathogenesis of experimental Johnes' s disease in calves. *Research in Veterinary Science*, v. 2, p. 167-174, 1961a.
- PAYNE, J.M. & RANKIN, J.D. A comparison of the pathogenesis of experimental Johnes' s disease in calves AND COWS. *Research in Veterinary Science*, v. 2, p. 175-179, 1961b.
- PEPIN, M.; MARLY, J. & PARDON, P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis. *The Veterinary Record*, v. 120, p. 236, 1987.
- PITOMBO, L.H. Mais uma doença para preocupar o produtor. *DBO Rural*. Ano 18, n. 222, p. 92-94, 1999.
- PLANTE, Y.; REMENDA, B.W.; CHELAK, B.J. HAINES, D.M. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 60, p. 115-120, 1996.
- 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.; PIMENTEL, J.N.; SALIBA, A.M.; BALDASSI, L.; SANDOVAL, E.F.D. Ocorrência de paratuberculose no estado de Santa Catarina. *Biológico*, v. 4, n.1/2, p.19-24, 1979.
- POUPART, P.; COENE, M.; VAN HEUVERSWYN, H. & COCITO, C. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johnes' s disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 1601-1605, 1993.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. & HINCHCLIFF, K.W. Paratuberculosis (Johnes' s disease). *In: Veterinary Medicine.* 9^a Ed. W.B.Saunders Company Ltd. San Francisco p. 920-934, 2000.
- RAMOS, E.T.; POESTER, F.P.; CORREA, B.L.; DE OLIVEIRA, S.J.; RODRIGUES, N.C.; CANABARRO, C.E. Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*, Ano. 6, n. 34, p. 28-32, 1986.
- RATNAMOHAN, T.N.; NORRIS, M.J.; MITCHELL, G. & SPENCER, T.L. A reappraisal of the complement fixation test using soluble *M. avium* antigen for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 63, p. 133-134, 1986.

- REVIRIEGO, F.J.; MORENO, M.A. & DOMINGUEZ, L. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 43, p. 43-51, 2000.
- RIDGE, S.E.; HARKIN, J.T.; BADMAN, R.T.; MELLOR, A.M. & LARSEN, J.W.A. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 72, p. 150-153, 1995.
- RIEMANN, H.; ZAMAN, M.R.; RUPPANNER, R.; AALUND, O.; JORGENSEN, J.B.; WORSAAE, H. & BEHYMER, D. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 174, p. 841-843, 1979.
- RIEMANN, H.P. & ABBAS, B. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v. 27, p. 481-506, 1983
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; WASSERMAN, R. & KOOK, L. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (*Solanacea*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 7, p. 85-95, 1987.
- RINGDAL, G. Culture of *Mycobacterium johnei*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 4, p. 85-91, 1963.
- RIS, D.R.; HAMEL, K.L. & AYLING, J.M. Can sheep become infected by grazing pasture contaminated by cattle with Johnes disease? *New Zealand Veterinary Journal*, v. 35, p. 137, 1987 *apud* MORGAN, I. Literature review of cross-species infections with *Mycobacterium paratuberculosis*. *The Paratuberculosis Newsletter*, v. 11, p. 8-24, 1999
- RIS, D.R.; HAMEL, K.L. & WEAVER, A.M. Natural transmission of Johnes disease to feral goats. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 36, p. 98-99, 1988 *apud* MORGAN, I. Literature review of cross-species infections with *Mycobacterium paratuberculosis*. *The Paratuberculosis Newsletter*, v. 11, p. 8-24, 1999
- RITACCO, V.; LOPEZ, B.; KANTOR, I.N.; BARRERA, L. & NADER, A. Reciprocal cellular and humoral response in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, v. 50, p. 365-367, 1991.
- RIVERA, F.E.B. Levantamento sorológico utilizando-se a técnica de ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose. *In: I Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul*. Campo Grande, MS, p. 20-22, 1996.
- ROBINSON, W.F. & MAXIE, M.G. The cardiovascular system, p. 1-100, *In: Pathology of Domestic Animals* Jubb K.V.F. & Kennedy, P.C. & Palmer, N. (Ed.). Vol. 3, 4th. Ed. Academic Press, San Diego. 1993.
- ROSSITER, C.A. & BURHANS, W.S. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 12, n. 2, p. 383-415, 1996.
- ROTHEL, S.E.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C. & WOOD, P.R. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 67, p. 134-137, 1990.
- ROWBOTHAM, D.S.; MAPSTONE, N.P.; TREJDOSIEWICZ, L.K.; HOWDLE, P.D.; QUIRKE, P. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut*, v. 37, p. 660-667, 1995.

- RUBERY, E. A review of the evidence for a link between exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) and Crohn's disease (CD) in humans. *Paratuberculosis Newsletter*, v. 13, p. 5-13, 2001.
- SANDERSON, J.D.; MOSS, M.T.; TIZARD, M.L.; HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut*, v. 33, p. 890-896, 1992.
- SANFTLEBEN, P. Quest continues for fast, reliable test for bovine paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 197, p. 299-305, 1990.
- SANTOS, J.A.; SILVA, N.L. Sobre a 1^a. Observação da paratuberculose no Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, p. 5-14, 1956.
- SAXEGAARD, F. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 22, p. 312-313, 1985.
- SCHOREY, J.S.; CARROLL, M.C. & BROWN, E.J. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*, n. 277, p. 1091-1093, 1997 *apud* NIELSEN, S.S. Paratuberculosis in Danish dairy cattle. Interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage. PhD thesis. Epidemiology Department of Animal Science and Animal Health, The Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg, Denmark, 138p, 2002.
- SCHROEN, C.; KLUVER, P.; McDONALD, W.; BUTLER, K.; CONDRON, R. & HOPE, A. Survival of *M. paratuberculosis* in the environment. Report to Meat and Livestock Australia, 1990 *apud* MANNING, E.J.B. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties*, v. 20, p.133-150, 2001.
- SEITZ, S.E.; HEIDER, L.E.; HUESTON, W.D.; BECH-NIELSEN, S.; RINGS, D.M. & SPANGLER, L. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 194, p. 1423-1426, 1989.
- SHERMAN, D.M. & GEZON, H.M. Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 177, p. 1208-1211, 1980.
- SHERMAN, D.M.; MARKHAM, R.J.F. & BATES, F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 185, p. 179-182, 1984.
- SHERMAN, D.M. Current concepts in Johne's disease. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, v. 80, p. 77-84, 1985.
- SHERMAN, D.M. ; BRAY, B. ; GAY, J.M. & BATES, F. Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, p. 525-530, 1989.
- SHERMAN, D.M. ; GAY, J.M. ; BOULEY, D.S. & NELSON, G.H. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 51, p. 461-465, 1990.
- SHINNICK, T.M. & GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. *European Journal Of Clinical Microbiology and Infections Diseases*, v. 13, p. 884-901, 1994 *apud* BREES, D.J.; REIMER, S.B.; CHEVILLE, N.F.; FLORANCE, A. & THOEN, C.O. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-

- fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *Journal of Veterinary Diagnostician Investigation*, v. 12, p. 60-63, 2000.
- SIBLEY, L.; HUNTER, P.; BRENNAN, P. & KRAHENBUHL, J. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma-interferon mediated activation of macrophages. *Infections and Immunity*, v. 56, p. 1232-1236, 1988.
- SIGURDSSON, B. Immunological problems in paratuberculosis. *Bacteriology Review*, v. 20, p. 1-13, 1956.
- SILVA, N.M.; PIZELLI, G.N. Estudos sobre a paratuberculose I. Diagnóstico de um caso da doença. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v. 4, p. 169-173, 1961.
- SILVA, N.M. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 3, p. 285-289, 1968.
- SIMPSON, C.F. Electron microscopy of arteriosclerosis in cow with Johne's disease. *American Journal Veterinary Research*, v. 27, p. 1197-1204, 1966.
- SMITH, H.W. The isolation of mycobacteria from the mesenteric lymph nodes of domestic animals. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 68, p. 367-372, 1954.
- SMITH, K. Electron microscopical observation on *Mycobacterium johnei*. *Research of Veterinary Science*, v. 10, p. 1-3, 1969.
- SMYTHE, R.H. The clinical aspects of Johne's disease. *The Veterinary Record*, v. 15, p. 85-86, 1935.
- SMYTHE, R.H. & CHRISTIE, G.J. Some observation on Johne's disease with a further note on the examination of faecal samples. *The Veterinary Record*, v. 62, p. 429-450, 1950.
- SMYTHE, R.H. Some observations on Johne's disease. *The Veterinary Record*, v. 63, p. 359-363, 1951.
- SNOW, G.A. Mycobactins: iron chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriology Review*, v. 34, p. 99-125, 1970 *apud* JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. & KANEENE, J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n.12, p. 735-740, 1997.
- SOCKETT, D.C.; CARR, D.J. & COLLINS, M.T. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 56, p. 148-153, 1992a
- SOCKETT, D.C.; CONRAD, T.A. THOMAS, C.B. & COLLINS, M.T. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1134-1139, 1992b.
- SOLTYS, M.A.; ANDRESS, C.E. & FLETCH, A.L. Johne's disease in a moose (*Alces alces*). *Bulletin of Wildlife Diseases*, v. 3, p. 183-184, 1967.
- SPEARS, H.N. III. Vaccination against Johne's disease: the results of a field trial experiment. *The Veterinary Record*, v. 71, p. 1154-1156, 1959.
- STABEL J.R. & GOFF, J.P. Influence of vitamin D₃ infusion and dietary calcium on secretion of interleukin 1, 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.; ACKERMANN, M. & GOFF, J.P. Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of Johne's disease in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostician Investigation*, v. 8, p. 469-473, 1996.

- 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.
- 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.; STEADHAM, E.M.; BOLIN, C.A. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.4975-4977, 1997.
- STAMP, J.T. & WATT, J.A. Johne's disease in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, v.64, p. 26-40, 1954.
- STEHMAN, S.M. Moléstia de Johne (Paratuberculose) p.823-829. In: *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. Smith, B.P. (Ed.). Vol. 1. Manole, São Paulo. 1990.
- STENGER, S.; HANSON, D.A.; TEITELBAUM, R.; DEWAN, P.; NIAZI, K.R.; FROELICH, C.J.; GANZ, T.; THOMA-USZYNSKI, S.; MELIÁN, A.; BOGDAN, C.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; KRENSKY, A.M. & MODLIN, R.L. An antimicrobial activity of cytolytic T cell mediated by granulysin. *Science*, n. 282, p. 305-312, 1998 *apud* NIELSEN, S.S. Paratuberculosis in Danish dairy cattle Interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage. PhD Thesis. Epidemiology Department of Animal Science and Animal Health, The Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg, Denmark, 138p, 2002.
- STUART, P. Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *British Veterinary Journal*, v.121, p.289-318, 1965a.
- STUART, P. A pigmented *M. johnei* strain of bovine origin. *British Veterinary Journal*, v. 121, p. 332-334, 1965b.
- SUENAGA, K.; YOKOYAMA, Y.; OKAZAKI, K.; YAMAMOTO, Y. Mycobacteria in the intestine of Japanese patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*, v.90, p.76-80, 1995.
- SUGDEN, E.A.; CORNER, A.H.; SAMAGH, D.S.; BROOKS, B.W.; TURCOTTE, C.; SHAPIRO, J. & DUNCAN, J.R. A study of indirect enzyme immunoassay for ovine paratuberculosis using A and D antigens and lipoarabinomannan polysaccharide antigen. In: *Proceeding of 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Paris, France, p. 231-235, 1988.
- SUMMERS, B.A. Laboratory diagnosis of Johne's disease: potential source of error. *The Veterinary Record*, v.108, p.166-167, 1981.
- SUNG, N. & COLLINS, M.T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.999-1005, 1998.
- SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H. & ROSENBERGER, A.E. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 477-480, 1992a.
- 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, 1992b.
- SWEENEY, R.W. Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 12, n. 2, p. 305-312, 1996.

- SWEENEY, R.W.; JONES, D.E.; HABECKER, P. & SCOTT, P. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, p. 842-847, 1998.
- TANAKA, S.; SATO, M.; TANIGUCHI, T. & YOKOMIZO, Y. Relationship of acid phosphatase activity to ultrastructural features in mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 114, p. 81-91, 1996.
- TAYLOR, A.W. Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v.63, p. 333-336, 1951.
- TAYLOR, A.W. Experimental Johne's disease in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 63, p. 355-367, 1953a.
- TAYLOR, A.W. The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *Journal of Comparative Pathology*, v. 63, p. 368-373, 1953b.
- TAYLOR, A.W. Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 63, p. 333-336, 1957.
- TAYLOR, A.W.; WILKS, C.R. & McQUEEN, D.S. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. *The Veterinary Record*, v. 109, p. 532-533, 1981.
- TAYLOR, R.H.; FALKINHAM, J.O.; NORTON, C.D. & LECHEVALLIER, M.W. Chlorine, chloramina, chlorine dioxide, and zone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1702-1755, 2000.
- THOEN, C.O.; JARNAGIN, J.L. & RICHARDS, W.D. Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues: A three-year summary. *American Journal Veterinary Research*, v. 36, p. 1383-1386, 1975.
- THOEN, C.O.; RICHARDS, W.D & JARNAGIN, J.L. Mycobacteria isolated from exotic animals. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 170, p. 987-990, 1977.
- THOEN, C.O. & MUSCOPLAT, C.C. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 174, p. 838-840, 1979.
- THORESEN, O.F.; FALK, K. & EVENSEN, O. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 6, p. 195-199, 1994.
- THOMPSON, D.E. The role of mycobacteria in Crohn's disease. *Journal of Medical Microbiology*, v.41, p.74-94, 1994.
- THOREL, M.F. & HAAGSMA, J. Components of media used for isolation of certain slow growing mycobacteria. *Annales de Institut Pasteur / Microbiologie*, v. 138, p. 745-749, 1987.
- THOREL, M.F.; KRICHEVSKY, M.; LEVY-FREBAULT, V.V. 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.
- THORNTON, C.G.; MACLELLAN, K.M.; STABEL, J.R.; CAROTHERS, C.; WHITLOCK, R.H. & PASSEN, S. Application of the C₁₈ carboxypropylbetaine specimen processing method to recovery of *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis* from ruminant tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 5, p. 1783-1790, 2002.
- TWORT, F.W. & INGRAM, G.L. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proceeding Royal Society of London* v.84, p. 517-543, 1912 *apud* WHIPPLE, D.L.; CALLIHAN, D.R. & JARNAGIN, J.L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedures. *Journal of Veterinary Diagnostician Investigation*, v. 3, p. 368-373, 1991.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA) Ultraviolet radiation. In EPA guidance manual Alternative disinfectants and oxidants. USEPA, Washington p. 1-25, 1999 *apud* MANNING, E.J.B. & COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties*, v. 20, p.133-150, 2001.
- VALLÉ, H. & RINJARD, P. Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovines. *Revue Générale de Médecine Vétérinaire*, v. 43, p. 777-779, 1926 *apud* CHIODINI R.S. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice*, v.12, n. 2, p.313-343, 1996.
- VAN DER GIESSEN, J.W.B.; EGER, A.; HAAGSMA, J.; HARING, R.M.; GAASTRA, W.; VAN DER ZEIJST, B.A.M. Amplification of 16S rRNA sequence to detect *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*, v.36, p.255-263, 1992a.
- VAN DER GIESSEN, J.W.; HARING, R.M.; VAUCLARE, E.; EGER, A.; HAAGSMA, J. & VAN DER ZEIJST, B.A. Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1216-1219, 1992b.
- VAN DER GIESSEN, J.; VAN DIJK, L.; BLEUMINK-PLUYM, N.; EGER, T.; HAAGSMA, J. & VAN DER ZEIJST, B. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implication for pathogenesis and diagnosis. In: *Proceedings of 4th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Cambridge, UK, p. 61-66, 1994.
- VAN KRUININGEN, H.J. RUIZ, B. GUMPRECHT, L. Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 199-202, 1991.
- VANNUFFEL, P.; GILOT, P.; LIMBOURG, B.; NAERHUYZEN, B.; DIETERRICH, C.; COENE, M.; MACHTELINCKX, L. & COCITO, C. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 1211-1216, 1994.
- VARY, P.H.; ANDERSEN, P.R.; GREEN, E.; HERMON-TAYLOR, J. & MCFADDEN, J.J. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 933-937, 1990.
- WALL, S.; KUNZE, Z.M.; SABOOR, S.; SOUFLERI, I.; SEECHURN, P.; CHIODINI, R.; MCFADDEN, J.J. Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of

- patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p. 1241-1245, 1993.
- WATERS, W.R. Immunology of inflammatory diseases of the bowel. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 17, p. 517-534, 2001.
- WATT, J.A.A. Johne's disease in a bovine associated with a pigmented strain of *Mycobacterium johnei*. *The Veterinary Record*, v. 66, p. 387, 1954.
- WAYNE, L.G. & KUBICA, G.P. *The Mycobacteria In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P.H.A.(Ed.) vol.2, Baltimore, USA, p.1435-1457, 1986.
- WELLS, S.J.; WAGNER, B.A. & DARGATZ, D.A. Factors associated with *M.a. paratuberculosis* Infection in U.S. Dairy Herds. *In: Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Australia, p. 62-65, 1999.
- WHIPPLE, D.L. & MERKAL, R.S. Modification in the technique for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *In: Proceedings of the 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*. Ames, Iowa, USA, p. 82-92, 1983.
- WHIPPLE, D.L. & MERKAL, R.S. Procedures for the field and laboratory processing of fecal specimens for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proceedings of US Animal Health Association*, v. 89, p. 475-479, 1985.
- WHIPPLE, D.L.; CALLIHAN, D.R. & JARNAGIN, J.L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedures. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 3, p. 368-373, 1991.
- WHIPPLE, D.L.; KAPKE, P.A. ANDERSEN, P.R. Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* on bovine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 4, p. 23-27, 1992.
- WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.; TURNER, M.J.; McALLISTER, S.; CHOY, E.; EAMENS, G.J.; MARSHALL, D.J. & OTTAWAY, S. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples for ruminant and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 701-707, 1998.
- WHITTINGTON, R.J. DNA typing of Johne's disease organisms. Final Report .NSW Agriculture, Camden, NSW. 1998 *apud* MORGAN, I. Literature review of cross-species infections with *Mycobacterium paratuberculosis*. *The Paratuberculosis Newsletter*, v. 11, p. 8-24, 1999.
- WHITLOCK, R.H. & DIVERS, T. Johne's Disease: a case of study with clofazimine therapy, *Proceedings of the 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*, Ames, Iowa, USA, v.14, p.231-237, 1983.
- WHITLOCK, R.H.; HUTCHINSON, L.T.; MERKAL, R.; GLICKMAN, L.T.; ROSSITER, C.; HARMON, S.; SPENCER, P.; FETROW, J.; BRUCE, J.; BENSON, C.E. & DICK, J. Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the northeastern US. *Proceedings of US Animal Health Association*, v.89, p. 484-490, 1985.
- WHITLOCK, R. H.; ROSENBERGER, A.E. & SPENCER, P.A. Laboratory culture techniques for Johne's disease: A critical evaluation of contamination and incubation times. *In: Proceeding of 93rd Annual Meeting US Animal Health Association*, v. 93, p. 382-386, 1989.

- WHITLOCK, R. H. & ROSENBERGER, A.E. Fecal culture protocol for Mycobacterium paratuberculosis, a recommended procedure. *In: Proceeding of 94th Annual Meeting US Animal Health Association*, v. 94, p. 280-285, 1990.
- WHITLOCK, R. H. & BUERGELT, C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology) *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 12, n. 2, p. 345-357, 1996.
- WILLIAMS, E.S.; SPRAKER, T.R. & SCHOONVELD, G.G. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and Rocky Mountain goat in Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 15, p. 221-227, 1979.
- WILLIAMS, E.S. ; De MARTINI, J.C. & SNYDER, S.P. Lymphocyte blastogenesis, complement fixation, and fecal culture as diagnostic tests for paratuberculosis in north american wild ruminants and domestic sheep. *American Journal Veterinary Research*, v. 46, p. 2317-2321, 1985.
- WILSON, D.J.; ROSSITER, C.A.; HAN, R.R. & SEARS, P.M. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American Journal Veterinary Research*, v. 54, p. 1851-1857, 1993.
- WILSON, D.J.; ROSSITER, C.A.; HAN, R.R. & SEARS, P.M. Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis culling and milk production in clinically normal dairy cattle. *In: Proceedings of 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. Madison, Wisconsin, USA, p. 151-158, 1996.
- WITHERS, F. Incidence of disease. *The Veterinary Record*, v. 71, p. 1150-1153, 2000.
- WOOD, P.R.; KOPSIDAS, K.; MILNER, A.R.; HILL, J.; GILL, I.; WEBB, R.; MACK, W.N. & COATES, K. The development of an in vitro cellular assay for the Johne's disease in cattle *In: Johne's disease: Current Trends in Research Diagnosis and Management*. CSIRO Publication. Melbourne. Australia p. 164-167, 1989.
- WOOD, P.R.; CORNER, L.A. & PLACKETT, P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis base on the production of γ -interferon. *Research in Veterinary Science*, v. 49, p. 46-49, 1990.
- WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; BALDOCK, C.; JONES, S.L.; COUSINS, D.B.; McCORNICK, B.S.; FRANCIS, B.R.; CREEPER, J. & TWEDDLE, N.E. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 68, p. 286-290, 1991.
- WOOD, P.R.; BILLMAN-JACOB, H.; MILNER, A.R. & CARRIGAN, M. Serological and cellular assays for the diagnosis of mycobacterial infections in cattle. *In: Proceedings of 3rd International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis. p. 12-28, 1992.
- WOODS, G.L.; PENTOMY, E.; BOXLEY, M.J. & GATSON, A.M. Concentration of sputum by cytocentrifugation for preparation of smears for detection of acid-fast bacilli does not increase sensitivity of the fluorochrome stain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 1915-1916, 1995.
- WOODRUFF, T.S.; SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; HOFFSIS, G.F.; SPANGLER, E. & HEIDER, L.E. Serodiagnosis of bovine paratuberculosis by use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal Veterinary Research*, v. 52, p. 217-221, 1991.

- YOKOMIZO, Y.; MERKAL, R.S. & LYLE, P.A.S. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin g1 antibody to a protoplasmic-antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 2205-2207, 1983a.
- YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; & MERKAL, R.S. A method for avoiding false-positive reactions in a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of bovine paratuberculosis. *In: Proceedings of the 1st International Colloquium Research on Paratuberculosis*. Ames, Iowa, USA, p. 94-108, 1983b.
- YOKOMIZO, Y.; YUGI, H. & MERKAL, R.S. A method for avoiding false-positive reactions in a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of bovine paratuberculosis *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 47, p. 11-119, 1985.
- YOSHIMURA, H.H.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K.; MERKAL, R.S. Investigation of association of mycobacteria with inflammatory bowel disease by nucleic acid hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, p.45-51, 1987.
- ZURBRICK, B.G. & CZUPRYNSKI, C.J. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infections and Immunity*, v. 55, p. 1588-1593, 1987.
- ZWICK, L.S.; WALSH, T.F.; BARBIERS, R.; COLLINS, M.T.; KINSEL, M.J. & MURNANE, R.D. Paratuberculosis in a mandrill. *Journal of Veterinary Diagnostician Investigation*, v. 14, p. 326-328, 2002.