

**UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESE**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO E PATOLÓGICO DA  
PARATUBERCULOSE EM BÚFALOS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**DANIEL GUIMARÃES UBIALI**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO E PATOLÓGICO DA  
PARATUBERCULOSE EM BÚFALOS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**DANIEL GUIMARÃES UBIALI**

*Sob orientação da Professora*  
**Marilene de Farias Brito**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2016

636.20896

U15e

T

Ubiali, Daniel Guimarães, 1985-  
Estudo epidemiológico, clínico e  
patológico da paratuberculose em búfalos  
na região nordeste do Brasil / Daniel  
Guimarães Ubiali - 2016.  
45f.: il.

Orientador: Marilene de Farias Brito.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária  
Patologia e Ciências Clínicas.  
Bibliografia: f. 37-44.


1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Búfalo  
- Doenças - Teses. 3. Ruminante - Doenças  
- Teses. 4. Patologia veterinária - Teses.  
5. Diagnóstico molecular - Teses. 6.  
Imunohistoquímica - Teses. I. Brito,  
Marilene de Farias, 1960-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária Patologia e Ciências  
Clínicas. III. Título.

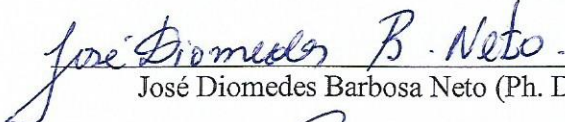
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA


DANIEL GUIMARÃES UBIALI


Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM 26/10/2016

  
Marilene de Farias Brito Queiroz (Ph. D) UFRRJ  
(orientadora)

  
José Diomedes Barbosa Neto (Ph. D) UFPA

  
Cícero Araújo Pitombo (Ph. D) UFF

  
Douglas McIntosh (Ph. D) UFRRJ

  
Pedro Antônio Muniz Malafaia (Ph. D) UFRRJ

*Aos ilustres Tokarnia & Döbereiner,  
pelos seus exemplos.*

*Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar.*  
Antonio Machado (poeta espanhol)

## AGRADECIMENTOS

À professora Marilene de Farias Brito pela sua dedicação diária e assídua, exemplar e contagiante.

Aos nobres exemplos que deram contribuições incomensuráveis não somente para este trabalho, mas para a pesquisa no Brasil, professor Carlos H. Tokarnia (*in memoriam*) e o pesquisador Dr. Jürgen Döbereiner.

Aos colegas, professores e funcionários do Setor de Anatomia Patológica e aos colegas do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, especialmente à técnica Letícia Baptista Pinto que prestou enorme auxílio laboratorial.

Aos professores José Diomedes Barbosa e Carlos Magno Chaves de Oliveira; aos veterinários José Alcides Sarmento da Silveira e Alessandra dos Santos Belo-Reis que me auxiliaram durante a viagem de campo. Assim como ao colega Raimundo Cassiano Figueiredo e ao colega Agnaldo da Silva Barbosa. Todos estes profissionais contribuíram enormemente durante as viagens de campo.

Aos professores Rinaldo Aparecido Mota e Douglas McIntosh e ao médico veterinário Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque que contribuíram grandemente com os exames moleculares para a realização deste trabalho.

A todos pecuaristas e veterinários que contribuíram com nossas visitas de campo.

À minha família, minha filha Lis Diaz Ubiali e minha companheira Yasmin Daoualibi que são sempre apoiadores.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter se tornado minha casa!

À Deus pela vida, saúde e oportunidade de cumprir nesta terra uma missão importante e envolvente!

## RESUMO

UBIALI, Daniel Guimarães. **Estudo Epidemiológico, Clínico e Patológico da Paratuberculose em Búfalos na Região Nordeste do Brasil**. 2015. 45f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Setor de Anatomia Patológica, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Com o objetivo de identificar focos e estudar a epidemiologia e o diagnóstico da paratuberculose em búfalos na região Nordeste do Brasil foram realizadas visitas e ou examinados material provenientes de 34 propriedades com suspeita clínica da doença. Obtivemos material biológico de sete estados da região Nordeste do Brasil (Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia). Dos rebanhos foi obtido o histórico, realizou-se avaliação clínica e inspeção das instalações e pastagens. Para a confirmação do diagnóstico foi coletado material para exames laboratoriais em 26 propriedades ou criações de búfalos, entre estes, dois matadouros e um quarentenário. Foram rebanhos cujo somatório de búfalos era de aproximadamente 15.600 búfalos, das raças Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e seus mestiços, com aptidão para corte, leite ou mista, em propriedades com regimes semi-intensivo, extensivo ou extrativista. Foram realizadas 22 necropsias e coleta de material para exames histopatológicos e imuno-histoquímicos, além de coloração de Ziehl-Neelsen em esfregaços de fezes, raspados de mucosa intestinal e fragmentos de linfonodo mesentérico e de intestino que apresentavam lesões sugestivas da doença. Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizadas amostras de fezes, leite, linfonodos mesentéricos e intestinos. Estes exames permitiram identificar oito focos de paratuberculose, o que nos permite inferir que a doença está se dispersando na região Nordeste do Brasil a exemplo do que está acontecendo em outras regiões do país com o rebanho bovino. O desconhecimento da doença, o manejo inadequado, o comércio não regulamentado de búfalos e a falta de um programa de controle voltado para a realidade da região facilitam a dispersão do agente e são fatores que contribuem para o aumento do número de focos no país. Os resultados desta pesquisa contribuem com a epidemiologia e o diagnóstico da doença em búfalos e auxilia na compreensão dos fatores que colaboram para a ocorrência crescente do número de casos desta doença.

**Palavras-chave:** Ruminantes. Doença de Johne. Patologia Veterinária. Diagnóstico Molecular. Diagnóstico Imuno-histoquímico.



## ABSTRACT

UBIALI, Daniel Guimarães. **Diagnosis of paratuberculosis in buffaloes in northeastern Brazil.** 2015. 52f. Tese (Doctor Science in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Setor de Anatomia Patológica, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

For investigation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection 34 buffaloes properties or ranches in Northeastern Brazil were visited for paratuberculosis diagnosis. Investigations included herd evaluations, inspection of facilities and pastures, obtainment of flock history, clinical examination of suspicious animals and collecting samples for diagnosis. Samples were obtained from 26 farms or ranches, including two slaughterhouses and a quarantine area in six states. Approximately 15,600 buffalos, including males and females of the Murrah, Mediterranean and Jafarabadi breeds as well as their crossbreeds, were evaluated for meat, dairy and mixed properties with semi-intensive or extensive regimes. For diagnostic purposes, necropsies, histopathological and immunohistochemical exams and Ziehl-Neelsen tests of fecal smears and scraped intestinal mucosa were performed. Polymerase chain reaction (PCR) methods were applied to samples of feces, milk, mesenteric nodes and intestines. This exams allowed us to identify eight new Johne's disease outbreaks, which, together with those previously identified by our staff, allow us to infer that the disease is being dispersed in the Brazilian Northeast, similar to what is occurring with bovine herds in other areas of the country. The increase in the number of positive farms is a consequence of the ignorance of farmers, inadequate health management, free trade of ruminants and lack of a official control program in the country. This study alerts for risk of commercialization of dairy products for human consumption, reinforces the importance of research on paratuberculosis in Brazil and contributes to the understanding of the factors that work together to increase the number of paratuberculosis cases in the Brazilian Northeast.

**Key words:** Ruminants. Johne's Disease. Veterinary Pathology. Molecular Diagnosis. Immunohistochemistry.

## ÍNDICE DE FIGURAS E MAPAS

<b>Figura 1</b>	(A-D) Criação de búfalos na sub-região de Sacoã, Baixada Maranhense evidenciando instalações simples em área urbana do município de Viana às margens do lago de Viana.	<b>18</b>
<b>Figura 2</b>	(A) Propriedade em Cajari onde observou-se hábito frequente de búfalos permanecendo aglomerados por longos períodos em áreas alagadas. (B) Sub-região do Moco-roca, Baixada Maranhense, município de Cajari, onde búfalos de diversos proprietários são criados coletivamente. (C,D) Instalações precárias de criação de búfalos na sub-região de Sacoã, Baixada Maranhense no município de Viana.	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	(A) Bezerro búfalo com pelagem suja de fezes devido à diarreia de vaca búfala. (B) Vaca búfala com fezes diarreicas na pele dos membros pélvicos e cauda. (C) Fezes diarreicas e espumosas de vaca búfala com paratuberculose. (D) Fezes diarreicas, verde escura e pastosa de vaca búfala com paratuberculose.	<b>20</b>
<b>Figura 4</b>	(A,B,D) Emagrecimento acentuado. (C) Edema submandibular. (E) Vaca búfala apresentando diarreia. (F) Vaca búfala com fezes diarreicas verde escura na pele.	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	(A) Superfície de corte de linfonodos mesentéricos aumentados e vasos linfáticos acentuadamente evidentes na serosa intestinal (setas). (B) Serosa da porção final do íleo com vasos linfáticos evidentes (setas) (a estrela indica o ceco). (C,D) Porção final do íleo com mucosa espessada formando grossas pregas longitudinais. (E) Linfonodo mesentérico com exsudato de aspecto leitoso. (F) Linfonodos mesentéricos aumentados, evidenciados através da superfície de corte.	<b>23</b>
<b>Figura 6</b>	(A) Enterite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides causando espessamento de vilosidade. HE, obj.20x. (B,D) Enterite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides ocupando espaço entre as glândulas intestinais. HE, obj.20x. (C,E) Grande quantidade de células gigantes multinucleadas, tipo Langhans na mucosa intestinal. HE, obj.40x e obj.63x. (F) Vaso linfático obstruído por infiltrado inflamatório linfocítico na submucosa intestinal. HE, obj.20x.	<b>24</b>
<b>Figura 7</b>	(A-D) Linfadenite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas distorcendo arquitetura tecidual dos linfonodos. HE, obj.20x (C, obj.40x).	<b>25</b>
<b>Figura 8</b>	(A) Grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes na mucosa do íleo. Ziehl-Neelsen, obj.40x. (B) Linfonodo mesentérico com grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.20x.	<b>25</b>
<b>Figura 9</b>	(A) Citopatologia de fezes com bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.100x. (B) Citopatologia de raspado de íleo com bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.40x.	<b>26</b>
<b>Figura 10</b>	(A-D) Íleo com imunomarcagem no interior de macrófagos e ou células gigantes multinucleadas (setas). Anticorpo primário monoclonal anti <i>Mycobacterium avium</i> , complexo avidina-biotina-peroxidase/DAB, (A,C obj.20x), (B,D obj.40x).	<b>27</b>
<b>Mapa 1</b>	Quantidade de propriedades visitadas por estado para o estudo da paratuberculose em búfalos na região Nordeste, Brasil.	<b>14</b>

**Mapa 2** Quantidade de propriedades positivas por estado para paratuberculose em búfalos na região Nordeste, Brasil. **18**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Investigação clínico-epidemiológica da paratuberculose no estado do Maranhão.	<b>28</b>
<b>Tabela 2</b>	Investigação clínico-epidemiológica da paratuberculose nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia.	<b>29</b>
<b>Tabela 3</b>	Exames complementares <i>post-mortem</i> da paratuberculose em bubalinos na região Nordeste do Brasil.	<b>30</b>
<b>Tabela 4</b>	Exames complementares <i>ante-mortem</i> da paratuberculose em bubalinos na região Nordeste do Brasil.	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIACÕES

BAARs	Bacilos álcool-ácido resistentes
CD	Doença de Crohn
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imuno enzimático
HE	Hematoxilina-eosina
IS900	“insertion sequence 900”
<i>Map</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
OIE	“Organization International des Epizooties”
pb	pares de bases
PBS	“phosphate buffer solution”
PCR	“polimerase chain reaction”
pH	Potencial hidrogeniônico
PSA	Projeto Sanidade Animal
RNA	Ácido Ribonucleico
SAP	Setor de Anatomia Patológica
Th	T “helper”
ZN	Ziehl-Neelsen

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Agente etiológico.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>3</b>
2.2.1	Situação no Brasil .....	3
<b>2.3</b>	<b>Patogênese.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4</b>	<b>Sinais Clínicos.....</b>	<b>6</b>
2.4.1	Bovinos e búfalos .....	6
2.4.2	Ovinos e caprinos.....	7
<b>2.5</b>	<b>Patologia .....</b>	<b>7</b>
2.5.1	Macroscopia .....	7
2.5.2	Histopatologia.....	8
<b>2.6.</b>	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>9</b>
2.6.1	Cultivo bacteriano.....	9
2.6.2	Diagnóstico imunológico .....	9
2.6.3	Sorologia .....	9
2.6.4	Imuno-histoquímica .....	10
2.6.5	Biologia molecular.....	10
<b>2.7.</b>	<b>Diagnóstico Diferencial .....</b>	<b>10</b>
<b>2.8</b>	<b>Controle .....</b>	<b>11</b>
<b>2.9</b>	<b>Paratuberculose e sua relação com a doença de Crohn .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Dados Clínicos e Epidemiológicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Necropsias.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Histopatologia.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4</b>	<b>Citopatologia .....</b>	<b>15</b>
<b>3.5</b>	<b>Imuno-histoquímica .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6</b>	<b>PCR.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Dados Clínicos e Epidemiológicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Necropsias.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Histopatologia e Citopatologia .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4</b>	<b>Imuno-histoquímica .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>PCR.....</b>	<b>27</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS, 3 ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A paratuberculose ou doença de Johne foi documentada pela primeira vez em bovinos no Brasil, no estado do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) é o agente etiológico que produz uma enterite granulomatosa crônica em ruminantes. Há registros dessa enfermidade em 12 estados do país em búfalos, bovinos, ovinos e caprinos (YAMASAKI et al., 2013b).

Após diversas publicações sobre o tema, a doença ainda é pouco conhecida pelos produtores rurais no Brasil (YAMASAKI et al., 2013b). As condutas relacionadas ao manejo desta enfermidade são inapropriadas e os prejuízos econômicos associados à presença e manutenção de rebanhos infectados com *Map* no país estão, provavelmente, subestimados. Pouco se conhece sobre a paratuberculose em búfalos no país, especialmente nas regiões Nordeste e Norte do Brasil (BRITO et al., 2014). Muito embora os búfalos tenham sido considerados menos suscetíveis à infecção pelo *Map* em relação aos bovinos (SIVAKUMAR et al., 2006), a doença já foi relatada nesta espécie nos estados de Pernambuco (MOTA et al., 2010), Maranhão (BARBOSA et al., 2010) e Rio Grande do Sul (DALTO et al., 2012). A doença em búfalos também foi diagnosticada em países como Índia (SIVAKUMAR et al., 2006; RAUT et al., 2003) e Itália (LILLINI et al., 1999).

As perdas econômicas causadas pela paratuberculose são significativas quando associadas ao longo período de emagrecimento e queda na produtividade dos animais. Essas perdas ocorrem, principalmente em rebanhos leiteiros e estão relacionadas à diminuição da produção de leite, do ganho de peso, da baixa eficiência reprodutiva, ao abate prematuro e à redução do valor da carcaça ao abate (HENDRICK et al., 2005); a doença é considerada uma potencial ameaça à indústria animal devido à sua natureza insidiosa (OIE, 2015).

Devido ao incremento no número de casos da doença em bovinos no Brasil é importante intensificar os estudos epidemiológicos nas regiões Nordeste e Norte, onde o número de bubalinos é significativo e tem alcançado um mercado consumidor cada vez mais atraente. O Brasil possui um rebanho de búfalos estimado em torno de 1.150.000 bubalinos, sendo a região Norte, com 720 mil animais, a maior produtora do País, com destaque para o Pará, que responde por 39% do rebanho nacional. Em seguida aparece o Nordeste com 135.000 cabeças (BRASIL, 2016).

A possibilidade de se identificar animais doentes e portadores da doença pode contribuir para reduzir os prejuízos econômicos. O objetivo desse estudo é identificar novos focos de paratuberculose clínica em búfalos, em diferentes localidades da região Nordeste do Brasil.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agente etiológico

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) é um bacilo álcool-ácido resistente, não móvel, mede aproximadamente 1-2x0,5µm, pertencente à família Mycobacteriaceae. É um Gram-positivo, intracelular e possui parede celular espessa, composta principalmente por lipídeos, o que lhe confere alta resistência a processos físicos como pasteurização e químicos como cloração da água (TIMMS et al., 2011; BANNANTINE et al., 2003).

O *Map* é encontrado tanto nas fezes quanto nos tecidos do hospedeiro como bacilos isolados, em pequenos agrupamentos ou em forma de rosetas, características que facilitam sua identificação. Os bacilos se mantêm aproximados por uma rede de filamentos intercelulares. O isolamento de *Map* pode ser feito a partir de fezes ou tecidos do hospedeiro. Os meios de cultivo comumente utilizados são *Herrold egg yolk médium* (HEYM), meio de *Dubos* modificado, *Middlebrook* e *Löwenstein-Jensen* acrescidos de micobactina (OIE, 2015; BUERGELT et al., 2004).

### 2.2 Epidemiologia

São altamente susceptíveis à infecção pelo *Map* bovinos, ovinos, caprinos, diversas espécies de artiodáctilos (mamíferos ungulados com número par de dedos nas patas) de cativeiro e ruminantes de vida livre como veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*), alce (*Cervus elaphus*), ovinos selvagens (*Ovis canadensis*), cabras da montanha rochosa (*Oreamnos americanus*) e bisão da América do Norte (*Bison bison*) (BUERGELT et al., 2004). Descrições de infecção pelo *Map* em búfalos são recentes no Brasil (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; DALTO et al., 2012; BELO-REIS et al., 2015) e também em outros países como na Índia (RAUT et al., 2003; SIVAKUMAR et al., 2006) e Itália (LILLINI et al., 1999).

São suscetíveis também à infecção pelo *Map* certas espécies de não-ruminantes como primata não-humano (*Macaca artiloides*) e coelhos selvagens da Escócia. A partir desse conceito de infecção pelo *Map*, é possível inferir que espécies de não ruminantes têm potencial de dispersar o *Map* pelo ambiente e transmitir a doença a hospedeiros suscetíveis (BUERGELT et al., 2004). Em humanos, pode ocorrer enterite granulomatosa e possíveis associações de infecções pelo *Map* com doenças humanas têm sido descritas (ATREYAA et al., 2014).

#### 2.2.1 Situação no Brasil

Ruminantes de criações leiteiras são as mais afetadas, pois o confinamento oferece condições para a propagação da infecção entre os indivíduos (NIELSEN & TOFT, 2008). No Brasil, as informações epidemiológicas não estão detalhadamente apresentadas. Os relatos de paratuberculose em bovinos leiteiros são relatados na região Nordeste, nos estados de Pernambuco (MOTA et al., 2007) e Paraíba (OLIVEIRA et al., 2008; MOTA et al., 2009); na região Sudeste nos estados do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915; DACORSO-FILHO, et al., 1960, YAMASAKI et al., 2010), São Paulo (FONSECA et al., 2000) e Minas Gerais (CARVALHO, 2008); na região Sul, em Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979), Rio Grande do Sul (DRIEMEIER et al., 1999); na região centro-Oeste, nos estados de Mato Grosso do Sul (RIVERA, 1996) e Goiás (ACYPRESTE et al., 2005) e na região Norte, no estado do Pará (SILVA, 2005).

, Apesar de os búfalos serem considerados menos susceptíveis à infecção pelo *Map* em relação aos bovinos (SIVAKUMAR et al., 2006), foram relatados, até o momento, casos clínicos de paratuberculose em duas regiões do Brasil. O primeiro caso foi descrito na região Nordeste, estado de Pernambuco por Mota et al., (2010), por Barbosa et al., (2010) no estado de Maranhão, e Dalto et al., (2012) relataram um caso clínico patológico de um rebanho bubalino infectado por *Map* na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul. Paratuberculose em pequenos ruminantes no país, foi descrita no estado de São Paulo (JACINTHO et al., 2009) e no estado da Paraíba em caprinos e ovinos (OLIVEIRA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2012a).

A principal via de infecção é a oro-fecal nos primeiros meses de vida do animal, no momento da ingestão de colostro ou leite e quando entram em contato com o úbere contaminado com fezes contendo a micobactéria (BEGG & WHITTINGTON, 2008). No Brasil, Dalto et al., (2012) relataram que bezerros do rebanho de bubalinos estudado, eram criados no sistema de aleitamento natural diretamente do úbere e vários bezerros mamavam coletivamente nas fêmeas lactantes; esta condição pode favorecer os índices de soropositivos no rebanho. Existem também, evidências de infecção intrauterina de bovinos, ovinos e búfalos em estágio avançado da doença, quando a fêmea gestante é portadora de grande quantidade de microrganismos e a anergia permite a migração de macrófagos infectados para outros órgãos através do sistema linfático (WHITTINGTON & WINDSOR, 2009; BARBOSA, 2015). Silva (1961) relatou presença de BAARs em baço de feto, cuja mãe apresentava sinais clínicos da enfermidade (PITHUA et al., 2011). A detecção de BAARs em feto de búfalo também foi observada em vaca búfala com sinais de paratuberculose (BELO-REIS et al., 2016).

A cronicidade e a prolongada transição entre os estágios da infecção, dificultam a detecção de todos os animais infectados no rebanho. A prevalência é muito variável entre os países, de acordo com a metodologia utilizada (isolamento bacteriano, sorologia, técnicas de biologia molecular) e o tipo de amostra analisada. Estima-se que cerca de 30 a 50% do rebanho mundial está infectado (BEHR & COLLINS, 2010). Em um rebanho bovino infectado, em média, 10% dos animais desenvolvem a doença, o restante, em sua maioria, elimina o agente através das fezes, sem apresentar os sinais clínicos ao longo de sua vida. A manifestação clínica pode estar relacionada a diversos fatores, tais como, ingestão de diferentes doses infectantes de *Map*, susceptibilidade individual à infecção e idade em que o animal teve o primeiro contato com o *Map* (NIELSEN & TOFT, 2008). Em um rebanho positivo, geralmente a mortalidade é menor que 1% ao ano e estima-se que até 70% dos animais podem estar infectados (TIMMS et al., 2011). Animais com diarreia eliminam maior quantidade de *Map* em comparação com indivíduos assintomáticos, que pode ocorrer em qualquer fase da infecção, além disso, a bactéria é raramente detectada antes dos dois anos de idade (CLARKE, 1997; BEHR & COLLINS, 2010; TIMMS et al., 2011).

A transmissão para animais adultos é considerada incomum. A resistência dos adultos à enfermidade é atribuída à maturidade do sistema imunológico (BUERGELT et al., 2004). No entanto a doença foi reproduzida experimentalmente em indivíduos adultos através da administração de diferentes doses de *Map* (CLARKE et al., 2010; 2011). Em contrapartida, considera-se que os indivíduos adultos sejam os mais responsáveis pela disseminação dos BAARs ao ambiente (BUERGELT et al. 2004), entretanto pesquisas recentes revelaram que os bezerros também contribuem para disseminar bacilos através das fezes (WOLF et al., 2015).

A possibilidade de infecção entre as espécies também foi constatada experimentalmente (POESTER & RAMOS, 1994) respectivamente, em ovinos e caprinos, os quais desenvolveram a patologia após administração via oral, de emulsão de intestino e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose clínica. No entanto, estudos comparativos revelaram que isolados de *Map* de ovinos e de bovinos possuem características moleculares diferentes achado apresenta uma implicação epidemiológica importante nas propriedades em que as duas espécies

são criadas na mesma pastagem e, portanto, a infecção entre ovinos e bovinos pode ser bem menos frequente (DOUARRE et al., 2012). A identificação de diferentes cepas de microrganismos é uma ferramenta valiosa em investigações epidemiológicas (KAUR et al. 2011), e possibilita determinar, por exemplo, a fonte de infecção, os fatores de risco que influenciam na transmissão do patógeno, se a infecção é resultado da introdução de um animal proveniente de outro rebanho ou se está associada ao contato com o ambiente contaminado da propriedade. Isto facilita a avaliação de programas de controle regionais e adoção de medidas sanitárias estratégicas, direcionado para cada rebanho. O entendimento da diversidade genômica entre as cepas de *Map* também pode fornecer “*insights*” na compreensão dos mecanismos de especificidade de hospedeiro em associação com genótipos específicos, tanto nos casos clínicos quanto nos subclínicos (MOTIWALA et al., 2006).

### 2.3 Patogênese

A maioria dos ruminantes se infectam oralmente durante a fase jovem (BUERGELT et al., 2004), no entanto a fase de infecção no útero é muito importante em bovinos (CLARKE et al., 1997) e provavelmente representa uma importante fase de transmissão para búfalos (BELO-REIS et al., 2016).

Após a infecção pela via oral o *Map* se desloca no trato gastrointestinal, em direção às células M no íleo. Essas células são epiteliais da mucosa e especializadas em fagocitose, as quais representam uma via importante de transporte de macromoléculas e antígenos para o tecido linfóide intestinal. As bactérias são então transportadas aos macrófagos na lâmina própria e na submucosa. Em seguida os macrófagos realizam fagocitose dos bacilos que são excitados das células M e apresentam os antígenos aos linfócitos ao tecido linfóide associado ao intestino, o qual sensibiliza o sistema imune intestinal à presença da bactéria. O transporte de *Map* por células M representa uma importante via na fase inicial da infecção e permite que o bacilo chegue aos macrófagos situados abaixo da camada mucosa. A localização das placas de Peyer no íleo pode explicar o motivo das lesões serem usualmente localizadas nesta porção intestinal (CLARKE et al., 1997; BUERGELT et al., 2004).

Na fase de fagocitose, o patógeno dentro de macrófagos persiste e se multiplica no interior do fagossomo, com capacidade de se manter no ambiente intracelular devido à habilidade da micobactéria em bloquear a fusão do fagossomo com o lisossomo (ROHDE et al., 2007).

A tentativa dos macrófagos em conter, sem sucesso, a multiplicação intracelular dos bacilos, resulta na liberação de fatores solúveis e fazem quimiotaxia para novas células inflamatórias chegarem ao local. O efeito da invasão tecidual pelos bacilos é a multiplicação dos macrófagos e enterite granulomatosa nos segmentos mediano e distal do intestino delgado. O *Map* não causa danos às células intestinais, porém a inflamação ocorre e células gigantes se formam como parte da reação de hipersensibilidade tardia, e o resultado é o espessamento do tecido intestinal pelo acúmulo das células inflamatórias que compromete a absorção de nutrientes, a vascularização e a drenagem linfática (COUSSENS et al., 2010).

Na paratuberculose há períodos de flutuações da imunidade celular ou períodos em que ocorre resposta humoral quando o hospedeiro perde resistência frente ao agente. A doença é o reflexo da reação imune do hospedeiro e, durante o curso da infecção, há períodos de remissão e exacerbação da atividade imunológica (STABEL, 2010).

A imunidade específica contra micobactérias é essencialmente mediada por células; os anticorpos possuem eficácia limitada contra estes agentes e a sua destruição está principalmente relacionada a mecanismos intracelulares de eliminação através de macrófagos infectados. As respostas imunológicas não são bem conhecidas; no início da infecção há uma resposta celular e após a progressão da infecção, já na fase clínica observa-se uma resposta

humoral, desencadeada pela liberação de bacilos presentes no citoplasma de macrófagos que se rompem (COUSSENS et al., 2004).

A imaturidade dos macrófagos em animais jovens pode ser uma das causas da susceptibilidade à infecção dos animais jovens (MOMOTANI et al., 1988). Assume-se que geralmente os bezerros raramente eliminam *Map* das fezes e a transmissão bezerro para bezerro tem importância menor. No entanto um estudo com bezerros no Canadá evidenciou que há excreção de *Map* pelas fezes de bezerros, fortalecendo a hipótese de transmissão do bacilo pelos bezerros em fazendas de bovinocultura de leite (WOLF et al., 2015).

Já na fase terminal, ocorre o processo denominado, anergia, que permite que macrófagos infectados alcancem a corrente circulatória, provoquem bacteremia e disseminação do microrganismo para o fígado, rins, pulmões, trato reprodutor e úbere (CLARKE 1997, COUSSENS et al., 2010). Neste estágio, não é possível detectar nem a imunidade celular nem a imunidade humoral (STABEL, 2010).

A dinâmica de infecção pelo *Map* foi estudada sistematicamente através de dados longitudinais de três fazendas nos EUA durante aproximadamente 10 anos. Observou-se alta prevalência de infecção pelo *Map* devido ao elevado tempo de permanência das vacas nas propriedades. Observaram-se dois padrões distintos de dinâmica de infecção denominados progressivo e não-progressivo. O primeiro foi caracterizado por eliminação progressiva e contínua de bacilos e uma resposta imune humoral nítida. A paratuberculose não-progressiva foi caracterizada por pequena e intermitente eliminação de bacilos e uma resposta humoral considerada ausente (SCHUKKEN et al., 2015). As respostas imunológicas acerca da paratuberculose não são bem conhecidas (STABEL, 2010), portanto dados longitudinais e contínuos, obtidos com critérios rigorosos e durante longo período são essenciais para o entendimento da patobiologia e da epidemiologia da infecção pelo *Map* em rebanhos (SCHUKKEN et al., 2015).

## **2.4 Sinais Clínicos**

### **2.4.1 Bovinos e búfalos**

A apresentação clínica típica da paratuberculose ocorre em animais acima de dois anos de idade; a partir desta idade progride para a fase terminal e resulta em morte do animal. Os sinais clínicos são caracterizados por emagrecimento, apetite normal ou aumentado, desidratação, diarreia intermitente, profusa, homogênea, semifluida ou líquida, não responsiva a tratamentos e que, progressivamente, torna-se contínua e a eliminação das fezes ocorre sob forma de jato (CLARKE, 1997; BEHR & COLLINS, 2010). Este quadro foi observado em búfalos (BARBOSA et al., 2010, DALTO et al., 2012) e bovinos em diversas regiões do Brasil (DACORSO-FILHO et al., 1960; PORTUGAL et al., 1979; DRIEMEIER et al., 1999; RISTOW et al., 2006; MOTA et al., 2007; CARVALHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; YAMASAKI et al., 2010; FISS et al., 2015).

O infiltrado de células inflamatórias na mucosa e submucosa intestinal, desencadeia uma síndrome de má absorção, o que diminui a assimilação de nutrientes, reduz a eficiência produtiva e induz a perda de peso. Normalmente, a manifestação clínica da paratuberculose está associada com eventos de estresse como partos, deficiência nutricional e produção de leite elevada (CLARKE, 1997). Doenças intercorrentes como tuberculose foram relatadas (DRIEMEIER et al., 1999), ou outras enfermidades como mastite e problemas reprodutivos (MOTA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2010; DALTO et al., 2012).

## 2.4.2 Ovinos e caprinos

Os sinais clínicos em pequenos ruminantes são inespecíficos. Geralmente expressos por emagrecimento progressivo, emaciação nos estágios adiantados da infecção e fezes pastosas. Em geral não há diarreia (CLARKE, 1997; UZAL et al., 2016). Jacintho et al., (2009) relataram um caprino com paratuberculose no estado de São Paulo, que apresentou emagrecimento lento, fezes amolecidas, tosse e dificuldade respiratória. Oliveira et al., (2010) relataram paratuberculose em caprinos com dispneia, tosse, caquexia, desidratação, edema submandibular, arritmia cardíaca, áreas de alopecia com formação de crostas, pelos ásperos e quebradiços e, inclusive, apetite exacerbado em um caprino infectado com *Map*, no estado da Paraíba. Os autores relataram que um ovino com paratuberculose apresentou quadro de caquexia, fezes pastosas, áreas de alopecia bilateral na região toracolombar, alterações estas que se manifestaram após o parto. Em geral o diagnóstico de paratuberculose em ovinos e caprinos não é simples para ser estabelecido (CLARKE, 1997; UZAL et al., 2016).

## 2.5 Patologia

### 2.5.1 Macroscopia

**Bovinos e búfalos.** Observam-se lesões macroscópicas apenas na fase adiantada da infecção. À necropsia são vistos os vasos linfáticos subserosos intestinais dilatados, esbranquiçados e com aspecto varicoso, que podem se estender até o mesentério. A linfangite é um achado importante para o diagnóstico da paratuberculose à necropsia (UZAL et al., 2016). Nos casos mais graves as lesões se estendem desde o duodeno até o reto e caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, em que a serosa adquire aspecto anelado ou com formação de rugas e pregas transversais na mucosa, e aspecto microgranular com áreas de hiperemia e áreas esbranquiçadas em sua superfície. Os linfonodos mesentéricos encontram-se edematosos, aumentados de tamanho e ao corte protraí deixando fluir líquido seroso a leitoso (CLARKE, 1997; UZAL et al. 2016). As lesões macroscópicas descritas foram observadas por diversos autores em bovinos (DACORSO-FILHO, et al., 1960, PORTUGAL et al., 1979; DRIEMEIER et al., 1999; CUNHA et al., 2003; RISTOW et al., 2006; MOTA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; MOTA et al., 2009; YAMASAKI et al., 2010; FISS et al., 2015) e bubalinos (BARBOSA et al., 2010; MOTA et al., 2010; DALTO et al., 2012; BELO-REIS et al., 2015). Adicionalmente, alguns autores observaram mineralização das grandes artérias com a íntima dos vasos enrugada, esbranquiçada e com aspecto opaco; essas lesões foram confirmadas ao exame histopatológico em bovinos (DRIEMEIER et al., 1999; CUNHA et al., 2003, YAMASAKI et al., 2010) e também em bubalinos (DALTO et al. 2012).

**Ovinos e caprinos.** Nos pequenos ruminantes as lesões macroscópicas ocorrem com menor intensidade em relação aos bovinos e nem sempre estão visíveis. Em alguns casos pode-se observar parede intestinal espessada e enrugada, mucosa intestinal com aspecto granular, sem ulcerações e aumento dos linfonodos mesentéricos (CLARKE, 1997; UZAL et al., 2016). No entanto, Oliveira et al. (2010) relataram que ovinos infectados na região Nordeste do Brasil, apresentaram úlceras multifocais na mucosa de intestino delgado e cólon. Clarke (1997) relatou que pequenos ruminantes com sinais clínicos severos de paratuberculose podem não apresentar alterações macroscópicas, o que foi constatado por Jacintho et al., (2009) e Oliveira et al., (2010). Uma lesão particular é a coloração laranja-amarelada observada na mucosa do intestino de pequenos ruminantes infectados, causada por cepas pigmentadas de *Map* (CLARKE & LITTLE, 1996; SEVILLA et al., 2007; BEHR & COLLINS, 2010), o que foi igualmente relatado por Oliveira et al. (2010), que observaram mucosa intestinal e linfonodo mesentérico

com pigmentação de coloração amarelo-marrom em ovino com sinais clínicos de paratuberculose.

### 2.5.2 Histopatologia

**Bovinos e búfalos.** Há duas classificações histopatológicas da paratuberculose: forma tuberculoide ou “*paucibacillary*”, na qual o infiltrado inflamatório, principalmente na mucosa e submucosa do intestino delgado, é composto de linfócitos e alguns macrófagos contendo poucas micobactérias, que está relacionada à marcada resposta imune celular e corresponde ao início ou à fase latente da infecção. A outra forma é denominada lepromatosa ou “*multibacillary*” e caracteriza-se por infiltração granulomatosa com formação de células gigantes de Langhans, que contém inúmeros BAARs na mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso, e está associada à forte resposta humoral (PÉREZ et al., 1996; CLARKE, 1997; CORPA et al., 2000). As vilosidades apresentam-se espessadas e atrofiadas dependendo do estágio da infecção. Há proliferação fibroblástica ao redor dos plexos nervosos, linfangiectasia e linfangite granulomatosa na subserosa. Os linfonodos mesentéricos também apresentam lesões granulomatosas, na zona cortical, paracortical e medular, e presença de BAARs. A forma “*multibacillary*” foi descrita por vários autores brasileiros em bovinos (DACORSO-FILHO et al., 1960; PORTUGAL et al., 1979; DRIEMEIER et al., 1999; CUNHA et al., 2003, RISTOW et al. 2006; MOTA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; MOTA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2010) e em bubalinos (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; DALTO et al. 2012), nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste do país. Presença de granulomas no parênquima hepático também foram descritos tanto nos bovinos (DRIEMEIER et al., 1999; CUNHA et al., 2003; YAMASAKI et al., 2010) como nos bubalinos (DALTO et al., 2012).

**Ovinos e Caprinos.** Em pequenos ruminantes, há infiltração inflamatória por linfócitos na lâmina própria da mucosa intestinal e as lesões são consistentes com a forma tuberculoide da infecção (KRUZE et al., 2006). Oliveira et al., (2010) observaram infiltração inflamatória, predominantemente por macrófagos e poucos linfócitos e plasmócitos em caprinos e ovinos com sinais clínicos da paratuberculose, no entanto, outros indivíduos destas mesmas espécies, sem a manifestação clínica, apresentaram infiltração predominantemente linfocítica. Adicionalmente, Jacintho et al., (2009) observaram área focal de necrose na submucosa intestinal, associado ao infiltrado supurativo e granulomatoso.

A classificação das lesões histológicas da paratuberculose clínica e subclínica em ovinos desenvolvido por Pérez et al., (1996) foi utilizada por Oliveira et al., (2010) em um caprino e um ovino com a forma clínica da enfermidade, que apresentou lesão multibacilar difusa (CORPA et al., 2000) e lesão lepromatosa (PÉREZ et al., 1996), respectivamente. Na classificação proposta por Pérez et al., (1996) observam-se acentuada lesão macroscópica e histológica, similares às descrições dos casos clínicos de outros autores (CLARKE & LITTLE, 1996; KHEIRANDISH et al., 2008); há numerosos macrófagos e poucas células gigantes distribuídas difusamente na lâmina própria e submucosa intestinal, fusão dos vilos e espessamento do intestino. Podem ser observados BAARs nos macrófagos da lâmina própria, e em menor quantidade nos tecidos linfoides do intestino e linfonodos. Oliveira et al., (2010) relatam ainda, que outros indivíduos, com a forma subclínica, apresentaram enterite linfocítica difusa (PÉREZ et al., 1996; CORPA et al., 2000).

## 2.6. Diagnóstico

### 2.6.1 Cultivo bacteriano

O *Map* é uma bactéria que apresenta crescimento lento; sob condições ótimas, são necessárias, aproximadamente, 16 semanas para se formarem colônias visíveis (OIE, 2015). O sucesso do isolamento depende de fatores como a composição do meio de cultura, a natureza da amostra clínica (sangue, fezes, leite, tecidos), o uso ou não de um protocolo de descontaminação, o estágio (recente ou avançado) e a forma (clínica ou subclínica) da infecção (TIMMS et al., 2011). Apesar de o cultivo bacteriano ser considerado pela OIE, o teste “*gold standard*”, a sensibilidade varia entre 50% e 70% quando o isolamento é feito a partir de amostras fecais de bovinos (STABEL, 1997; COLLINS et al., 2006; TIMMS et al., 2011). Desta forma, as taxas de prevalência podem estar subestimadas quando determinadas por esta técnica. Os meios de cultivo comumente utilizados para o isolamento de *Map* são *Herrold egg yolk medium* (HEYM), meio de *Dubos* modificado, *Middlebrook* e *Löwenstein-Jensen* acrescidos de micobactina (KLANIKOVA et al., 2012; OIE, 2015). Mesmo sendo considerado o teste “*gold standard*” (OIE, 2015), o cultivo bacteriano tem se mostrado impraticável para fins de diagnóstico devido principalmente ao seu longo período destinado ao crescimento de *Map* (BUERGELT et al., 2004).

### 2.6.2 Diagnóstico imunológico

Durante a doença clínica, ocorre tanto a resposta mediada por células quanto a resposta humoral contra *Map*, no entanto, anticorpos, geralmente, estão ausentes durante as fases iniciais da infecção, o que torna necessário o uso de metodologias baseadas na detecção da resposta celular (TIMMS et al., 2011). Existem métodos para a detecção da imunidade mediada por células contra a infecção pelo *Map*: o teste de tuberculina intradérmico, com o uso de jonina ou PPD aviário, e o teste  $\gamma$ -IFN. No teste intradérmico avalia-se a reação de hipersensibilidade causada pela resposta imune celular. Este foi o teste mais utilizado no passado para detecção da infecção precoce pelo *Map* (KALIS et al., 2003), no entanto, o seu uso é limitado devido à inespecificidade. Testes cervicais comparativos (TCC) com PPD (“*protein purified derivative*”) de origem mamífera e aviária revelaram acentuada reação edematosa no local de inoculação da PPD aviária e ausência de reação à PPD mamífera em bovinos (PORTUGAL, et al., 1979; YAMASAKI et al., 2010) e ovino com paratuberculose (OLIVEIRA et al., 2010). Porém, os resultados do TCC devem ser interpretados com cautela, pois, a reação à PPD aviária está associada à exposição ou infecções causadas por diversos agentes do complexo *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. avium* e *Map*) e por *Nocardia farcinus* (LILENBAUM et al., 2007). A exposição à micobactérias saprófitas presentes no ambiente, também pode sensibilizar os animais, resultando em reações de hipersensibilidade do tipo tardia inespecífica (SCOTT, et al., 2010), o que pode dar margem a interpretações errôneas, como os falso-negativos.

### 2.6.3 Sorologia

Durante a fase clínica da doença há resposta humoral que pode ser detectada por testes sorológicos como: fixação de complemento, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e imunodifusão em gel de ágar (AGID, *Agar gel immunodiffusion*) (OIE, 2015), no entanto, nenhum deles é considerado sensível o suficiente para detectar a infecção subclínica (OIE, 2015). Estudos sorológicos a nível internacional demonstraram que entre 7 e 40% dos rebanhos distribuídos pelos cinco continentes estão infectados com *Map* (USDA, 2005). A sensibilidade do ELISA é altamente dependente do estágio da infecção; o teste apresenta alta sensibilidade,

cerca de 75%, quando a infecção está na fase clínica ou terminal. Em contraste, nos estágios iniciais ou latentes da infecção a sensibilidade é baixa, aproximadamente de 15% (COLLINS et al., 2006; TIMMS et al., 2011). No Brasil há dificuldade em se obter laboratórios que realizam rotineiramente diagnóstico sorológico de paratuberculose.

#### **2.6.4 Imuno-histoquímica**

O teste de imuno-histoquímica (IHQ) tem sido utilizado por diversos pesquisadores no intuito de confirmar a infecção por *Map*, em diagnósticos pós-mortais em ruminantes (OLIVEIRA et al., 2010; DALTO et al., 2012; MOMOTANI et al., 2012). A IHQ possui elevada sensibilidade para detecção de *Map*, o que confere boa confiabilidade ao teste, principalmente em casos contendo poucas bactérias. A presença do agente infeccioso no tecido é amplificada e marcada por corante específico, o que minimiza as possibilidades de diagnóstico falso-positivo devido às imunorreações inespecíficas (WEBSTER et al., 2010). O exame de imuno-histoquímica pode auxiliar na compreensão da patogênese (KRÜGER et al., 2015). Além disso, Dalto et al., (2012) relataram que a biópsia retal pode ser mais uma ferramenta para confirmação do diagnóstico de paratuberculose em búfalos; nos fragmentos analisados pelos autores, haviam BAARs e ao teste de imuno-histoquímica, foram positivos para detecção de *Map*.

#### **2.6.5 Biologia molecular**

Atualmente, testes moleculares baseados na PCR “*polymerase chain reaction*” e “*real time*” PCR têm sido ferramentas importantes na identificação de elementos genéticos para diagnosticar a paratuberculose em ruminantes (CASTELLANOS et al., 2010). A vantagem da PCR frente a outras técnicas de diagnóstico é aumentar consideravelmente a sensibilidade dos testes para detecção de animais com a infecção subclínica (TIMMS et al., 2011).

Além disso, relatos recentes detectaram que a biópsia retal pode ser mais uma ferramenta para confirmação do diagnóstico de paratuberculose em búfalos; nos fragmentos analisados pelos autores, haviam BAARs e ao teste de PCR, foram positivos para detecção de *Map* (BELO-REIS et al., 2016).

Uma das principais diferenças entre o *Map* e outras bactérias do complexo *M. avium* é a presença de 14 a 18 cópias do elemento de inserção IS900 no genoma do *Map* (GREEN et al., 1989); este é o fragmento de DNA mais utilizado para detecção da micobactéria através da PCR (VANSNICK et al., 2004; IMIRZALIOGLU et al., 2011; TIMMS et al., 2011). As sequências de inserção são segmentos de DNA relativamente curtos, capazes de se transpor, de se inserir de forma aleatória e ocupar múltiplos locais no genoma de procariontes, e causa frequentemente, mutação de inserção e rearranjos dos cromossomos (MOTIWALA et al., 2006). Em certos casos, os fragmentos específicos com localização definida no genoma, podem ser utilizados em estudos epidemiológicos como marcador para identificação de espécies ou diferenciação entre as cepas de microrganismos (DOMBEK et al., 2000). A presença de múltiplas cópias desta sequência no cromossomo do *Map* eleva a sensibilidade dos testes quando comparados com testes que utilizam como alvos os fragmentos genéticos únicos (IMIRZALIOGLU et al., 2011).

### **2.7. Diagnóstico Diferencial**

Deve-se diferenciar a paratuberculose dos ruminantes de outras doenças que causam diarreia, emagrecimento e inflamação granulomatosa. Inclui-se no espectro de enfermidades, que de alguma forma possa se confundir com a paratuberculose, as helmintoses, disenteria de



inverno, diarreia viral bovina, intoxicação crônica por flúor, acidose ruminal, intoxicação por polpa cítrica, intoxicação por *Brachiaria* spp. e doenças carenciais (deficiência de energia, proteína e minerais como cobre, cobalto e fósforo).

Helmintoses em bubalinos e bovinos adultos é rara e ocorre em situações de baixa imunidade como na deficiência de fósforo (TOKARNIA et al., 2010) e na paratuberculose. Ovinos e caprinos adultos são suscetíveis às verminoses e deve-se diferenciar de paratuberculose, uma vez que ambas causam emagrecimento e diarreia crônica.

Na infecção pelo coronavírus há a chamada disenteria de inverno e afeta bovinos adultos, no entanto ocorre sob a forma de surtos que perduram por cerca de uma semana (PAVARINI et al., 2008). Diferente da paratuberculose cujo quadro clínico é crônico.

Na diarreia viral bovina o quadro clínico é associado à anorexia, febre, afeta bovinos de diversas idades e cursa com alta letalidade e morbidade (UZAL et al., 2016). Na paratuberculose há baixa mortalidade e não há sinal de febre associada.

Na intoxicação por Flúor há diarreia intermitente, diminuição da produção de carne e/ou leite e mau estado geral semelhante à paratuberculose, no entanto na fluorose há lesões em ossos e dentes associados à claudicação e escurecimento de dentes (RIET-CORREA et al., 1983; TOKARNIA et al., 2010).

As diarreias osmóticas (não infecciosas) também podem ser observadas em ruminantes quando, após semanas a meses de privação de alimento, os animais são realimentados, principalmente após rápida rebrota de forrageiras; fato comumente observado após secas prolongadas com restrição na quantidade de matéria seca de forragem. Isso ocorre devido à atrofia das papilas ruminais, oriunda da pouca produção dos AGVs durante o período seco (Malafaia, 2015); nesses casos a doença é aguda e auto-limitante. Na acidose ruminal há diarreia osmótica e aguda por sobrecarga de carboidratos (BROWN et al., 2007), diferente do caráter crônico da paratuberculose.

Nas intoxicações por polpa cítrica e por ervilhaca (*Vicia* spp.) há lesões granulomatosas em diversos órgãos como pele, baço, linfonodos e coração (BARROS et al., 2001). Na paratuberculose as lesões são caracterizadas por enterite e linfadenite granulomatosas.

A intoxicação por *Brachiaria* spp. também cursa com presença de agrupamentos multifocais de macrófagos espumosos em linfonodos mesentéricos e no fígado (DRIEMEIER et al. 1999), nesses casos, diferentemente da paratuberculose, não há bactérias marcadas pela histoquímica de ZN e as lesões de pele dão o aspecto diferencial.

A deficiência de cobre condicionada ao excesso de molibdênio cursa também com emagrecimento e diarreia (TOKARNIA et al., 2010). Nesses casos, diferentemente da paratuberculose, há descoloração de pelos ao redor dos olhos, e ou um aspecto desbotado difuso da pelagem de alguns animais e a hemossiderose em órgãos linfoides (MORAES et al., 1999; TOKARNIA et al., 2010). Já nas deficiências de cobalto e de fósforo (TOKARNIA et al., 2010) há apenas similaridade com a paratuberculose em relação ao emagrecimento.

## 2.8 Controle

Os tratamentos com fármacos quimioterápicos são ineficientes para ruminantes afetados pela paratuberculose (BUERGELT et al., 2004). A dificuldade em controlar a doença de Johne está principalmente relacionada em se detectar os animais subclínicos, devido ao longo período de incubação da doença. Outros fatores que tornam o controle um grande desafio são a eliminação constante do agente pelas fezes, os numerosos casos subclínicos nos rebanhos, a baixa sensibilidade dos testes diagnósticos disponíveis e a prolongada resistência do *Map* no ambiente (BRITO et al., 2014).

No Brasil não existem vacinas disponíveis (BRITO et al., 2014), no entanto, em alguns países disponibilizam vacinas comercialmente, contudo devem ser usadas sob rígida vigilância

(BUERGELT et al., 2004). A vacina atenuada ou inativada, usada em programas de controle de paratuberculose, causa forte reação imune no local da aplicação e os animais subclínicos vacinados permanecem eliminando as bactérias nas fezes. Essas vacinas também provocam reação cruzada e interferem nos testes diagnósticos de tuberculose, tornando-as inviáveis para uso em programas de erradicação. Para a real eficácia, a vacinação deve ser associada ao descarte de animais com sinais clínicos (BRITO et al., 2014).

Mesmo diante da inexistência de um programa oficial de prevenção e controle da paratuberculose no Brasil, a Organização Mundial de Saúde Animal recomenda a adoção de boas práticas sanitárias e de manejo de rebanho, tais como:

- Realizar quarentena e realizar os testes diagnósticos disponíveis.
- Em rebanhos afetados, realizar vigilância contínua de animais adultos através de testes sorológicos pelo menos semestralmente (por no mínimo 5 anos para pequenos ruminantes e 15 anos para bovinos e bubalinos) e eliminar os animais positivos.
- Manter áreas limpas para nascimentos dos animais.
- Fornecer sucedâneos e colostros aos recém-nascidos.
- Separar os ruminantes jovens dos adultos até pelo menos a idade de um ano.
- Minimizar o contato de ruminantes jovens a áreas de esterco.
- Melhorar o rigor na higienização das instalações, impedindo contaminação fecal, ou seja, realizando rápida limpeza de currais, salas de ordenha e outros ambientes coletivos.
- Elevar os comedouros e bebedouros afim de se evitar a contaminação com fezes. Desta mesma maneira, realizar rápida limpeza em casos de contaminação.
- Não comercializar animais doentes ou com sinais clínicos sugestivos desta enfermidade (BRITO, et al., 2014).

## 2.9 Paratuberculose e sua relação com a doença de Crohn

Dalziel (1913) descreveu a semelhança clínica e patológica entre duas doenças crônicas inflamatórias intestinais, a paratuberculose em bovinos e a Doença de Crohn (CD) em humanos.

A DC é uma doença inflamatória crônica que afeta principalmente o trato gastrointestinal e é caracterizada por diversidade bacteriana reduzida. A causa exata da doença é desconhecida. No entanto, há evidências de que vários componentes, incluindo microorganismos, podem contribuir para o desenvolvimento da doença. Perturbação da relação comensal entre hospedeiros e microrganismos é considerada a principal força motriz da destruição dos tecidos e alterações patológicas vistas em CD. Vários patógenos bacterianos putativos incluindo espécies de micobactérias, *Campylobacter* e *Helicobacter*, são postulados na etiologia da CD. No entanto, nenhuma evidência confirma que uma única bactéria contribui com a patogênese da CD. Alternativamente, a disbiose, ou desequilíbrio bacteriano, é uma hipótese mais amplamente aceita como um fator principal no sistema imune do hospedeiro comprometido, resultando em inflamação intestinal subsequente. Depleção de microrganismos simbióticos incluindo *Firmicutes*, *Bifidobacteria* e *Clostridia*, em conjunto com um aumento em patógenos como *Bacteroides* e *Enterobactérias* é uma característica marcante observada em CD. Nenhum factor foi identificado como principal na patogênese desta disbiose, apesar de dieta, exposição a antibióticos e possíveis eventos precoces da vida, em presença de susceptibilidade genética subjacente poder contribuir (ALHAGAMHMAD et al., 2016).

Há uma controvérsia sobre o papel etiológico do *Map* na CD, o que implicaria uma natureza zoonótica de *Map* (ATREYAA et al., 2014). A doença de Crohn é uma inflamação crônica de qualquer parte do intestino de humanos, com maior frequência a porção terminal do íleo e ou cólon. É uma doença que usualmente afeta adolescentes ou adultos jovens. Os sinais clínicos variam conforme a localização das lesões. Em casos de lesões no íleo, os pacientes

apresentam sinais que mimetizam a apendicite, enquanto outros pacientes com lesões no cólon os sinais são de dor abdominal e diarreia frequentemente com hemorragias (BUERGELT et al., 2004).

Patologicamente a CD é caracterizada por enterite granulomatosa transmural com ulceração extensa e possível fístula. Embora os BAARs não possam ser detectados pela coloração de ZN, estudos ultra-estruturais demonstraram microorganismos no interior de macrófagos de pacientes com doença de Crohn. *Map* foi isolado através de métodos tradicionais em apenas uma pequena quantidade de pacientes com doença de Crohn, no entanto uma grande parcela desses pacientes revelou a presença de DNA de *Map* através da técnica de PCR (BUERGELT et al., 2004).

Devido à permanência de *Map* no trato digestório de animais e no meio ambiente, esse microorganismo pode sobreviver às intempéries e contaminar fontes de água destinadas a humanos. Outra possibilidade de infecção de humanos com *Map* é através de leite contaminado, uma vez que diversos estudos revelaram que os processos tradicionais de pasteurização não são suficientes para eliminar o *Map*. O estudo da doença de Crohn demonstrou que humanos são desafiados ao *Map* oriundo de água ou leite contaminado por períodos prolongados podem acumular os bacilos no íleo ou cólon e desenvolver a infecção e os sinais subsequentes durante algum episódio de stress ou doença intercorrente (BUERGELT et al., 2004; ATREYAA et al., 2014).

O *Map* é um agente patogênico obrigatório em ruminantes com um tropismo para o intestino, o que não é visto por quaisquer outras espécies de micobactérias. Além disso, há fortes indícios de que o *Map* pode causar infecções oportunistas em espécies hospedeiras monogástricas com lesões granulomatosas no intestino e outras áreas, mas sem sinais clínicos. Estudos epidemiológicos revelaram que *Map* é mais frequentemente detectado no tecido intestinal de pacientes com CD do que em voluntários saudáveis. No entanto, o *Map* também é encontrada frequentemente em amostras de pessoas saudáveis e o papel etiológico da *Map* na doença humana ainda não foi comprovada (ATREYAA et al., 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Foram avaliados rebanhos de 34 propriedades que reuniram cerca de 15.600 búfalos, com aptidão para corte, leite ou mista, machos e fêmeas, das raças Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e seus mestiços. Foram investigadas criações extensivas, com manejo precário; outras com regime semi-intensivo e manejo razoável a bom que atingiam excelentes níveis zootécnicos. Foram realizadas visitas a 34 propriedades de bubalinos na região Nordeste do Brasil (Maranhão, Paraíba, Alagoas e Bahia), dois matadouros (Pernambuco) e também amostras para exame histopatológico de bubalinos de um quarentenário (Ceará), com o objetivo de identificar focos de paratuberculose (Mapa 1). Das propriedades visitadas no estado do Maranhão 16 eram localizadas na região da Baixada Maranhense, a qual é caracterizada por grandes planícies baixas que alagam na estação das chuvas, criando enormes lagoas entre os meses de janeiro e julho. Em cada estabelecimento visitado foram avaliadas extensão da propriedade, tamanho do rebanho, instalações, pastagens e histórico clínico (Tabela 1). As propriedades foram classificadas quanto ao tipo de exploração zootécnica em extensiva nas fazendas que usavam pastejo contínuo com forrageiras cultivadas e havia áreas delimitadas por cercas; semi-intensiva nas fazendas que faziam uso de suplementação protéico-energética ou extrativistas nas criações que o pastejo era contínuo com forrageiras nativas, não faziam uso de suplementação mineral e não tinham áreas de propriedades delimitadas.

Os parâmetros clínicos avaliados foram escore corporal, hidratação e aspecto das fezes. Exames complementares como necropsias, exames histopatológicos e imuno-histoquímicos, coloração de Ziehl-Neelsen em esfregaços de fezes, raspados de mucosa intestinal, *imprint* de linfonodos mesentéricos, bem como PCR das fezes, leite e de fragmentos de intestino e de linfonodos mesentéricos foram feitos a partir de amostras de animais que apresentavam sinais clínicos e ou lesões sugestivas ou compatíveis com a doença (Tabela 2). Estes exames foram realizados no Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no Laboratório de Biologia Molecular da UFRRJ e no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.



**Mapa 1.** Quantidade de propriedades visitadas por estado para o estudo da paratuberculose em búfalos na região Nordeste, Brasil.

#### 3.2 Necropsias

Foram realizadas 22 necropsias de búfalos. A eutanásia foi realizada segundo as diretrizes da prática de eutanásia recomendadas pela Resolução Normativa Nº 13, de 20 de setembro de 2013, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os órgãos foram avaliados macroscopicamente e coletou-se amostras para diagnóstico (Tabela 3).

### 3.3 Histopatologia

Amostras de diversos órgãos foram obtidas em 22 necropsias, e sete amostras foram encaminhadas para diagnóstico as quais foram fixadas em formol a 10% tamponado com fosfato, processadas rotineiramente para histologia e coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). Nas secções histológicas com lesões suspeitas ou sugestivas de paratuberculose, realizou-se a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (Tabela 3).

### 3.4 Citopatologia

Foram realizados exames citológicos de fezes em sete amostras clínicas (Tabela 4); nos búfalos necropsiados, realizou-se em sete casos, raspados de mucosa do íleo que foi estirado em lâminas de vidro; também foram feitos *imprints* de linfonodos mesentéricos em sete casos. Após secagem, as lâminas foram fixadas em metanol e submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen.

### 3.5 Imuno-histoquímica

Secções histológicas de intestino e ou de linfonodos mesentéricos, referentes a 22 búfalos provenientes de seis fazendas e dois abatedouros (Tabela 3), foram cortadas em micrótomo a 5µm e aderidas a lâminas de vidro, previamente tratadas com silano (3-aminopropyl-triethoxysilane). As secções foram desparafinadas em xilol, lavadas em álcool e hidratadas em água destilada. A peroxidase endógena tecidual foi inativada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em solução aquosa por 30 minutos. As secções foram lavadas com água destilada, e a recuperação antigênica foi realizada com protease XIV (Sigma, cat.P5147), na concentração de 0,2mg/ml, por 30 minutos à 37°C. Novamente as secções foram lavadas com água destilada, e realizou-se o bloqueio das reações inespecíficas com leite em pó desnatado (Molico) a 5% em solução aquosa por 30 minutos à temperatura ambiente. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-*Mycobacterium avium* (GeneTex, cat.20905), “overnight” a 6°C em diluição de 1:250 em “phosphate buffer saline” (PBS), pH 7,4. Após a lavagem utilizou-se o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc.) por 20 minutos e a revelação das reações foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). As secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com lamínulas. Controles positivos foram casos de paratuberculose previamente confirmados (Yamasaki et al. 2013). As secções foram consideradas positivas através da visualização de imagens compatíveis com a morfologia de *Map* no interior de macrófagos e ou em células gigantes multinucleadas.

### 3.6 PCR

Amostras de fragmentos de linfonodo mesentérico íleo e ceco obtidos de 28 búfalos, foram retirados com o auxílio de lâmina de bisturi estéril e acondicionadas em tubos de

polietileno tipo *ependorf* e armazenadas em freezer a -20°C até o processamento. Essas amostras foram obtidas em todas as propriedades onde se realizou exames pós-mortais (Tabela 3).

As amostras de fezes foram coletadas em oito propriedades onde se realizou exames clínico dos búfalos (Tabela 4); foram acondicionadas em tubos de polietileno tipo *ependorf* e armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.

Amostras de leite foram obtidas no tambor de armazenamento da propriedade ou criação, correspondente ao leite ordenhado diariamente de todas as vacas búfalas de cada rebanho, em oito propriedades ou criações (Tabela 4). Essas amostras foram acondicionadas em tubos de polietileno tipo *falcon* de 10ml e armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.

As amostras de fezes foram submetidas à extração de DNA com kit comercial QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®).

As amostras de tecido foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA), utilizando-se protocolo do fabricante.

As amostras de leite foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), utilizando-se protocolo do fabricante.

O DNA obtido dessas amostras (de tecido, fezes e leite) foi identificado e armazenado em tubos de polietileno tipo *ependorf* e armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.

As reações com amostras de DNA extraídas de fezes, leite ou tecido foram preparadas para as amplificações em um volume final de 15µL contendo: 5µL de DNA genômico; 0,5µL dos *primers* específicos para IS900 a 20pMol (DF: 5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e o DR-1: 5'-CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'); 2,75µL de água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTD) com desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, em seguida 35 ciclos a 95°C por 1 minuto cada, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos (TADDEI et al., 2008). O produto amplificado de 99pb correspondente ao DNA do *Map* foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *bluegreen* e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Neste estudo foram identificados oito focos de paratuberculose em criações de bubalinos, sendo sete em fazendas no estado do Maranhão e uma fazenda no estado de Alagoas (Tabelas 1 e 2).

Em todas as propriedades visitadas se observou acesso coletivo dos bubalinos a áreas alagadas, onde permaneciam aglomerados por longos períodos (Fig.2A). Alimentação em cochos coletivos foi uma prática comum nas propriedades visitadas. A adoção do sistema de aleitamento com “ama de leite”, em que utilizam três a cinco bezerros-búfalos por vaca-búfala foi observada na propriedade visitada em Alagoas.

Especificamente na sub-região de Sacoã, na Baixada Maranhense observou-se criações de búfalos em áreas urbanas na beira do lago de Viana, o qual não é definido como propriedade dos criadores de búfalos (Fig.1A-D). Nessas áreas urbanas as instalações são muito simples (Fig.2C,D) e as práticas de higiene são praticamente ausentes. Na sub-região de Mocaróca observou-se que diversos criadores mantinham seus rebanhos de búfalos criados coletivamente (Fig.2B) e a identificação de cada rebanho de búfalos era realizada por cortes na orelha dos búfalos, os quais serviam para distinguir seus respectivos proprietários.

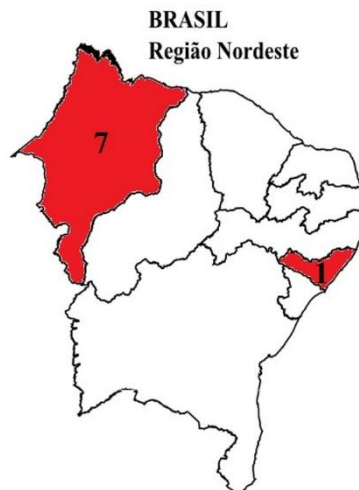
Através dos históricos obtidos com os criadores foi detectado que proprietários eliminavam os animais doentes, encaminhando-os para abate na evidência de emagrecimento. Nos históricos fornecidos pelos proprietários, estes são unânimes em afirmar o comércio não regulamentado de bubalinos entre propriedades dos diferentes Estados da região Nordeste. A compra de lotes de bubalinos magros para engorda, vindos da baixada maranhense foi relatada como prática frequente na região estudada. Este fato foi confirmado durante as visitas nas propriedades estudadas; houve compra de búfalos da Baixada Maranhense para as fazendas de São Mateus do Maranhão, MA, Parnarama, MA e São Luiz do Quitunde, AL.

Os históricos obtidos na Baixada Maranhense revelaram que os criadores ou proprietários conheciam a fase clínica da paratuberculose e a denominavam popularmente como “surrilha”, “diarreia” ou “caganeira” e estes só admitiam a doença quando os búfalos defecavam em forma de jatos (Fig.4E).

Os sinais clínicos observados nos búfalos com paratuberculose incluíram emagrecimento progressivo (Fig.4A,B,D), edema submandibular (Fig.4C), diarreia verde escura, espumosa e líquida (Fig.3C,D) e ocasionalmente observou-se conteúdo diarreico na pele dos búfalos com sinais clínicos da doença (Fig.3B,4F) ou de bezerros que eram mantidos no mesmo piquete que os búfalos doentes (Fig.3A); além de tenesmo, pelos ásperos, sem brilho e desbotados, desidratação, fraqueza e morte. O *score* corporal dos búfalos doentes variou entre 1 e 3 (escala 1-5). O histórico revelou que a diarreia era não responsiva às terapias antimicrobianas e em geral esses bubalinos ficavam segregados do rebanho.

Nos rebanhos positivos para paratuberculose foram identificadas doenças ou sinais clínicos concomitantes como verminose gastrointestinal em bubalinos adultos, aumento do intervalo entre partos, mastite, pelos ásperos e arrepiados e ectoparasitismo por piolhos. Os proprietários, em geral, não tinham conhecimento sobre a paratuberculose e incriminavam outras causas como mudança na alimentação, ingestão de corpos estranhos e verminose para justificar o quadro clínico.

Na Baixada Maranhense, onde se visitou 16 propriedades ou criações, havia emagrecimento de uma forma geral nos rebanhos, visto que as visitas foram realizadas no período seco do ano, porém era mais acentuado nos búfalos com quadro clínico de paratuberculose evidente.



**Mapa 2.** Quantidade de propriedades positivas por estado para paratuberculose em búfalos na região Nordeste, Brasil.

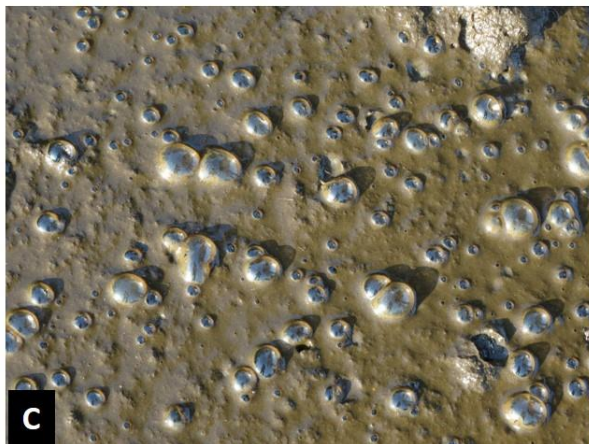


**Figura 1.** (A-D) Criação de búfalos na sub-região de Sacoã, Baixada Maranhense evidenciando instalações simples em área urbana do município de Viana às margens do lago de Viana.





**Figura 2.** (A) Propriedade em Cajari onde observou-se hábito frequente de búfalos permanecendo aglomerados por longos períodos em áreas alagadas. (B) Sub-região do Moco-roca, Baixada Maranhense, município de Cajari, onde búfalos de diversos proprietários são criados coletivamente. (C,D) Instalações precárias de criação de búfalos na sub-região de Sacoã, Baixada Maranhense no município de Viana.



**Figura 3.** (A) Bezerro búfalo com pelagem suja de fezes devido à diarreia de vaca búfala. (B) Vaca búfala com fezes diarreicas na pele dos membros pélvicos e cauda. (C) Fezes diarreicas e espumosas de vaca búfala com paratuberculose. (D) Fezes diarreicas, verde escura e pastosa de vaca búfala com paratuberculose.





**Figura 4.** (A,B,D) Emagrecimento acentuado. (C) Edema submandibular. (E) Vaca búfala apresentando diarreia. (F) Vaca búfala com fezes diarreicas verde escura na pele.

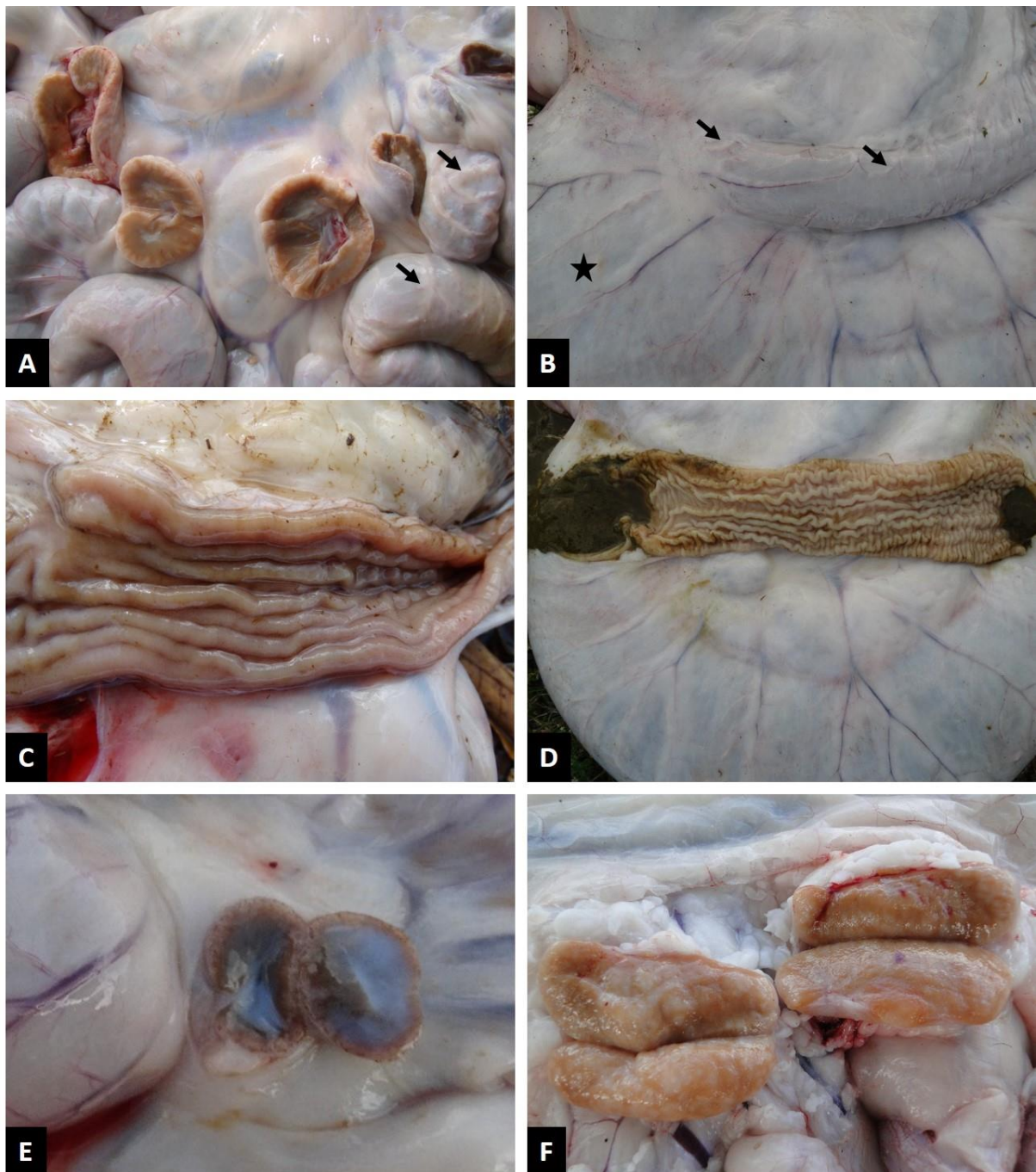
## 4.2 Necropsias

Dos 22 casos nos quais realizou-se necropsias, 15 foram de búfalos positivos para paratuberculose (Tabela 3). Identificou-se, a partir destes exames pós-mortais, seis fazendas



positivas. As alterações foram típicas e consistiram de emaciação, edema submandibular e cavitário, espessamento da parede intestinal com rugosidade da mucosa (Fig.5C,D) e conteúdo intestinal líquido e espumoso, aumento dos linfonodos mesentéricos (Fig.5A,F), ocasionalmente linfonodos com exsudato com aspecto leitoso (Fig.5E) e evidência de vasos linfáticos mesentéricos e intestinais (Fig.5A,B).

Outros achados macroscópicos foram encontrados, tais como parasitismo gastrointestinal (15/22), aderência do saco pericárdico com epicárdio (3/22), parasitismo por *Setaria* sp. (2/22) e polisserosite (1/22).



**Figura 5.** Bubalinos com paratuberculose na região Nordeste do Brasil. (A) Superfície de corte de linfonodos mesentéricos aumentados e vasos linfáticos acentuadamente evidentes na serosa intestinal (setas). (B) Serosa da porção final do íleo com vasos linfáticos evidentes (setas) (a estrela indica o ceco). (C,D) Porção final do íleo com mucosa espessada formando grossas pregas longitudinais. (E) Linfonodo mesentérico com exsudato de aspecto leitoso. (F) Linfonodos mesentéricos aumentados, evidenciados através da superfície de corte.

### 4.3 Histopatologia e Citopatologia

Exames histopatológicos foram realizados em todos os bubalinos necropsiados (N=22) e em sete búfalos provenientes de abatedouro no estado de Pernambuco, cujas amostras de intestinos e linfonodos mesentéricos foram encaminhadas para diagnóstico.

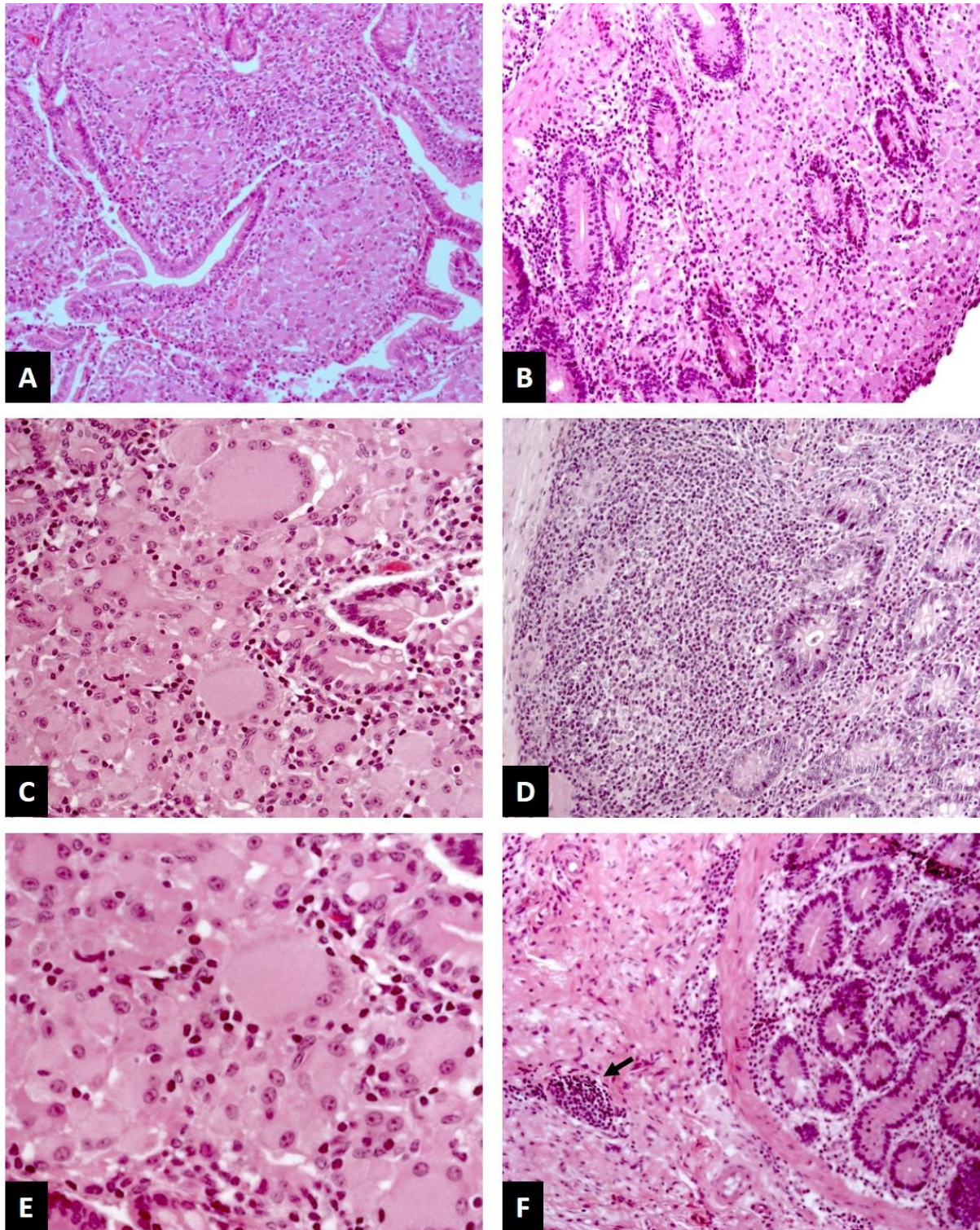
Observou-se enterite granulomatosa (Fig.6A-E) e linfadenite granulomatosa (Fig.7A-D) difusas, acentuadas e severas com grande quantidade de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas nos 15 bubalinos que apresentaram lesões macroscópicas compatíveis com paratuberculose. Ocasionalmente observou-se presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e ou macrófagos ao redor e ou no interior de vasos linfáticos (linfangite) (Fig.6F).

A coloração de Ziehl-Neelsen revelou presença de bacilos álcool-ácido resistentes em secções histológicas de intestinos (Fig.8A), linfonodos mesentéricos (Fig.8B) em 12/15 bubalinos.

A coloração de Ziehl-Neelsen revelou presença de bacilos álcool-ácido resistentes em 1/7 secções citológicas de esfregaços de fezes (Fig.9A). E a mesma coloração revelou positividade em 5/7 secções citológicas de *imprint* de raspados de mucosa do íleo (Fig.9B) e 4/7 linfonodos mesentéricos.

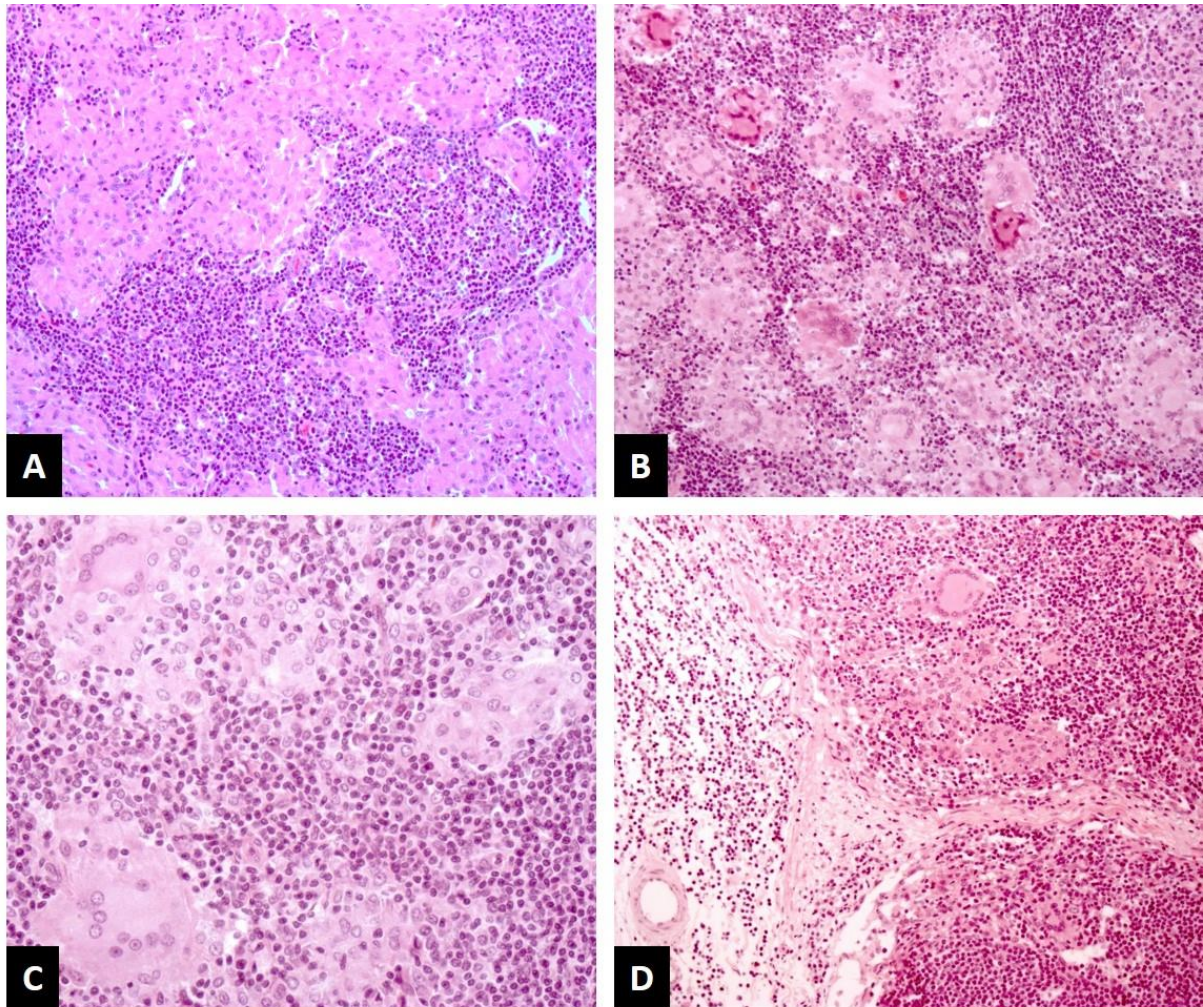
Outros achados microscópicos foram encontrados, tais como moderada hemossiderose em linfonodos mesentéricos, especialmente em búfalos do estado do Maranhão (6/30), assim como abomasite mononuclear leve (2/30). Em quatro das sete amostras obtidas no matadouro de Pernambuco observou-se lesões compatíveis com consumo de *Brachiaria* sp., nas quais observou-se presença de macrófagos espumosos, “*foam cells*”, formando aglomerados na mucosa intestinal e em linfonodos mesentéricos.



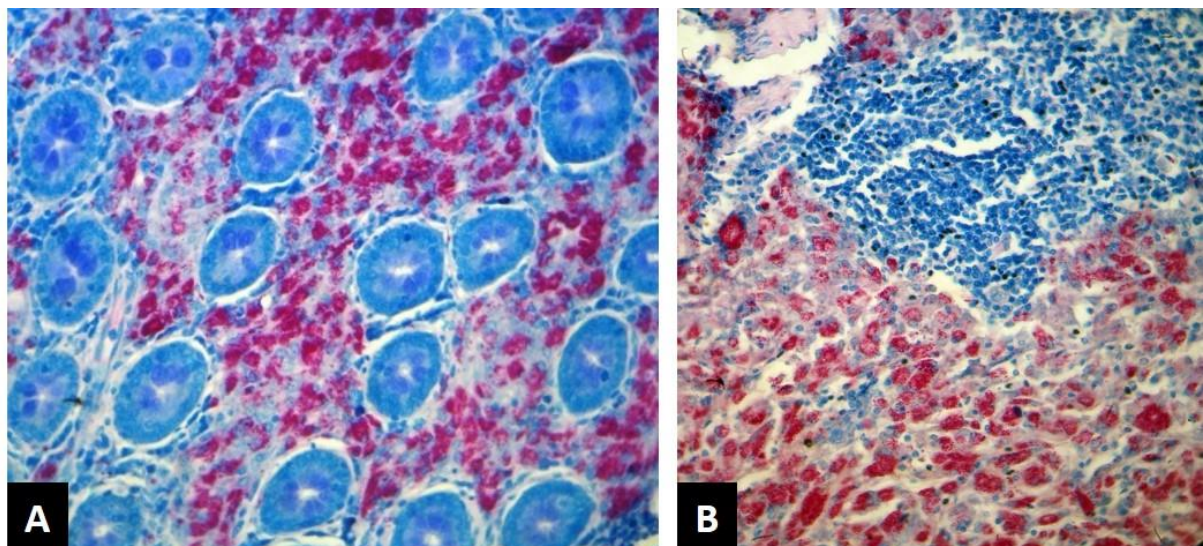


**Figura 6.** (A) Enterite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides causando espessamento de vilosidade. HE, obj.20x. (B,D) Enterite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides ocupando espaço entre as glândulas intestinais. HE, obj.20x. (C,E) Grande quantidade de células gigantes multinucleadas, tipo Langhans na mucosa intestinal. HE, obj.40x e obj.63x. (F) Vaso linfático obstruído por infiltrado inflamatório linfocítico na submucosa intestinal. HE, obj.20x.



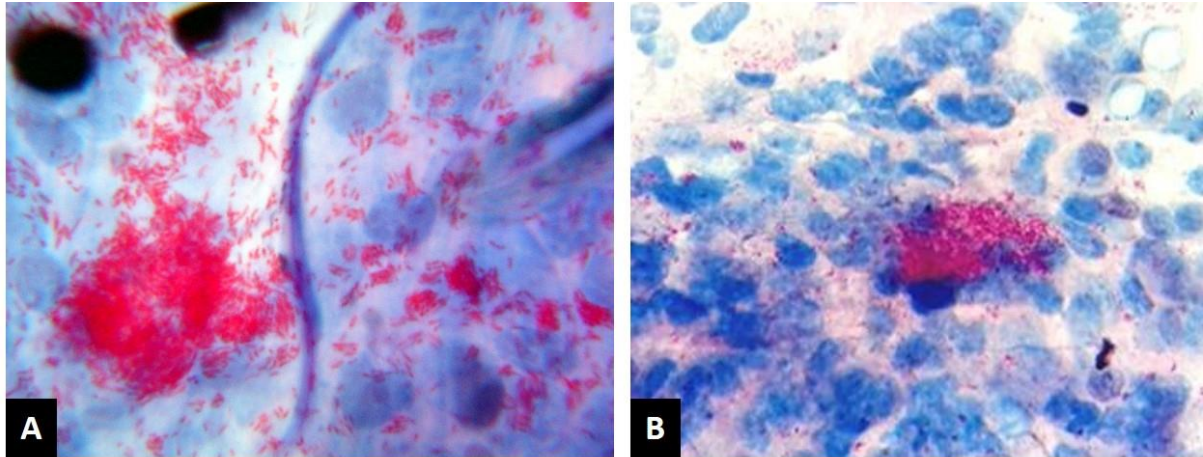


**Figura 7.** (A-D) Linfadenite granulomatosa com grande quantidade de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas distorcendo arquitetura tecidual dos linfonodos. HE, obj.20x (C, obj.40x).



**Figura 8.** (A) Grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes na mucosa do íleo. Ziehl-Neelsen, obj.40x. (B) Linfonodo mesentérico com grande quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.20x.



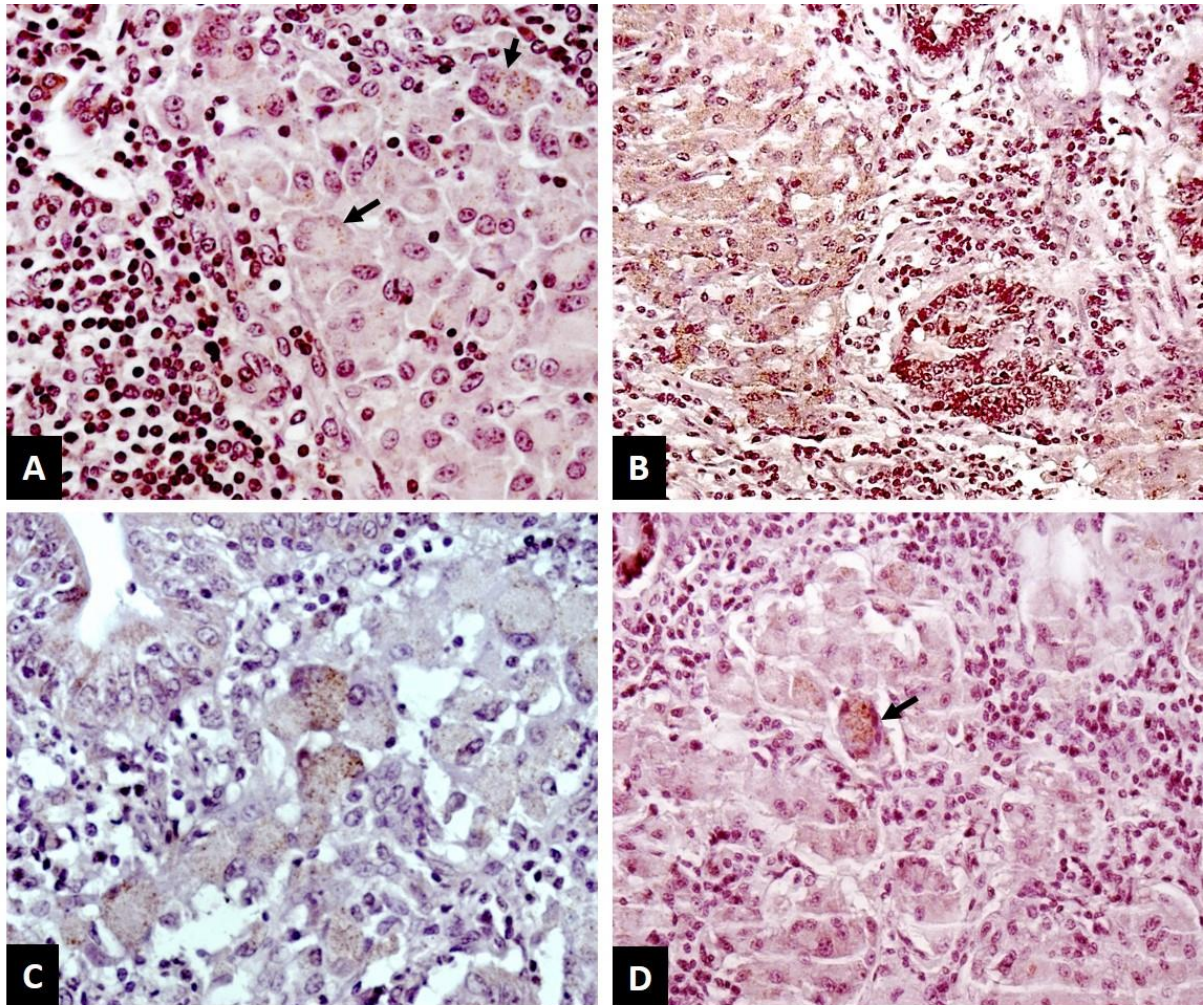


**Figura 9.** (A) Citopatologia de fezes com bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.100x. (B) Citopatologia de raspado de íleo com bacilos álcool-ácido resistentes. Ziehl-Neelsen, obj.40x.

#### 4.4 Imuno-histoquímica

De 22 amostras testadas com anti-*Mycobacterium avium*, houve imunomarcagem em 12 amostras, sendo 10 destas provenientes do estado do Maranhão e 2 amostras de Alagoas. A marcação foi compatível com a morfologia de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e ocorreu principalmente no interior de macrófagos e células gigantes multinucleadas (Fig.10A-D).





**Figura 10.** (A-D) Íleo com imunomarcção no interior de macrófagos e ou células gigantes multinucleadas (setas). Anticorpo primário monoclonal anti-*Mycobacterium avium*, complexo avidina-biotina-peroxidase/DAB, (A,C obj.20x), (B,D obj.40x).

#### 4.5 PCR

De 28 amostras frescas de intestino e ou linfonodo mesentérico para PCR, o DNA de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) foi amplificado em amostras de 12 búfalos em seis propriedades (Tabela 3). Além destas, dois focos foram identificados pela amplificação de DNA de *Map* a partir de amostras de fezes (Tabela 4). A investigação do DNA de *Map* através da PCR incluiu examinar oito amostras de leite através da PCR, as quais resultaram negativas (Tabela 4).

**Tabela 1.** Investigação clínico-epidemiológica da paratuberculose no estado do Maranhão.

Município	Fazenda/Área	Exploração zootécnica	Rebanho	Sinais clínicos		Diagnóstico da propriedade
				Emagrecimento	Diarreia	
São Mateus do Maranhão	Fazenda 1 / 8.600ha	Corte - extensiva	3527	sim	sim	Positiva
	Fazenda 2 / 1.500ha	Corte - extensiva	802	sim	sim	Positiva
São Luiz	Fazenda 3 / 1.500ha	Corte - extensiva	NI	sim	sim	Positiva
Vitória do Mearim (Baixada Maranhense)	Fazenda 4 / 110ha	Leite - extensiva	141	não	não	Negativa
	Fazenda 5 / 900ha	Leite - extensiva	350	não	não	Negativa
	Fazenda 6 / 132ha	Corte e leite - extensiva	300	sim	sim	Negativa
	Fazenda 7 / NI	Corte e leite - extensiva	NI	sim	sim	Positiva
	Fazenda 8 / 19ha	Corte - extensiva	27	sim	sim	Inconclusiva
	Fazenda 9 / 5ha	Corte - extensiva	10	sim	sim	Inconclusiva
	Fazenda 10 / 8ha	Leite - extensiva	20	sim	não	Inconclusiva
Cajari (Baixada Maranhense)	Fazenda 11 / 10ha	Leite - extensiva	14	sim	sim	Inconclusiva
	Fazenda 12 / 250ha	Corte - extensiva	93	sim	não	Inconclusiva
	Fazenda 13 / 250ha	Corte - extensiva	100	sim	sim	Inconclusiva
	Criação 14 / “Larga”	Leite - extrativista	20	sim	sim	Inconclusiva
	Criação 15 / “Larga”	Leite - extrativista	31	sim	sim	Inconclusiva
	Criação 16 / “Larga”	Leite - extrativista	20	sim	sim	Inconclusiva
	Criação 17 / “Larga”	Leite - extrativista	7	sim	sim	Inconclusiva
Viana (Baixada Maranhense)	Fazenda 18 / 400ha	Leite - extensiva	200	não	não	Negativa
	Fazenda 19 / 600ha	Corte - extensiva	300	sim	sim	Positiva
Parnarama (região limítrofe com o estado do PI)	Fazenda 20 / 4.900ha	Corte - extensiva	4.000	sim	sim	Positiva
	Fazenda 21 / 1.100ha	Corte - extensiva	1.900	sim	sim	Positiva

NI não informado.

**Tabela 2.** Investigação clínico-epidemiológica da paratuberculose nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia.

Estado /Município	Fazenda/Extensão	Exploração zootécnica	Rebanho	Sinais clínicos		Diagnóstico da propriedade
				Emagrecimento	Diarreia	
<b>Ceará</b>						
Paracurú	Quarentena 22 / NI	NI	NI	NI	NI	Negativa
<b>Paraíba</b>						
Rio Tinto	Fazenda 23 / 360ha	Corte - semi-intensiva	196	não	não	Negativa
Santa Rita	Fazenda 24 / 75ha	Corte - semi-intensiva	97	não	não	Negativa
Capim	Fazenda 25 / 75ha	Corte - semi-intensiva	62	não	não	Negativa
Sapé	Fazenda 26 / 230ha	Corte - semi-intensiva	23	não	não	Negativa
<b>Pernambuco</b>						
Barreiros	Abatedouro 27 / NI	Corte - semi-intensiva	NI	sim	não	Negativa
Palmares	Abatedouro 28 / NI	Corte - semi-intensiva	NI	sim	não	Negativa
<b>Alagoas</b>						
São Luiz do Quitunde	Fazenda 29 / 360ha	Leite - semi-intensiva	475	sim	sim	Positiva
<b>Bahia</b>						
São Sebastião do Passé	Fazenda 30 / 600ha	Leite - semi-intensiva	554	não	não	Negativa
	Fazenda 31 / 700ha	Leite - semi-intensiva	854	sim	sim	Negativa
	Fazenda 32 / 1.200ha	Leite - semi-intensiva	70	sim	sim	Negativa
Teodoro Sampaio	Fazenda 33 / 700ha	Leite - semi-intensiva	722	não	não	Negativa
Alagoinha	Fazenda 34 / 900ha	Leite - semi-intensiva	700	não	não	Negativa

NI não informado.

**Tabela 3.** Exames complementares *post-mortem* da paratuberculose em bufálos na região Nordeste do Brasil.

Estado/Município	Local de coleta	Nº de Necropsias (N) e ou Histopatologia (H) <sup>a</sup>	PCR amostras positivas <sup>b</sup> /testadas	IHQ amostras positivas/testadas	Diagnóstico
<b>Maranhão</b>					
São Mateus	Fazenda 1	12 N	7/12	5/6	Positiva
	Fazenda 2	2 N	1/1	2/2	Positiva
São Luiz	Fazenda 3	2 N	1/1	2/2	Positiva
Viana	Fazenda 19	1 N	1/1	1/1	Positiva
Parnarama	Fazenda 20	1 N	1/1	0	Positiva
<b>Ceará</b>					
Paracurú	Quarentenário 22	1 H	1/0	0	Negativa
<b>Pernambuco</b>					
Barreiros	Abatedouro 27	2 H	2/0	0/2	Negativa
Palmares	Abatedouro 28	5 H	5/0	0/5	Negativa
<b>Alagoas</b>					
São Luiz do Quitunde	Fazenda 29	3 N	2/3	2/3	Positiva
<b>Bahia</b>					
São Sebastião do Passé	Fazenda 31	1 N	0/1	0/1	Negativa

<sup>a</sup> Histopatologia com colorações de HE e Ziehl-Neelsen, <sup>b</sup> PCR realizado a partir de amostras frescas de intestinos e ou linfonodo mesentérico.

**Tabela 4.** Exames complementares *ante-mortem* da paratuberculose em bubalinos na região Nordeste do Brasil.

Estado/Município	Local de coleta	Ziehl-Neelsen citologia de fezes positivas/testadas	PCR amostras de fezes positivas /testadas	PCR amostras de leite positivas /testadas	Diagnóstico da propriedade	
<b>Maranhão</b>						
Vitória do Mearim	Fazenda 4	0/1	1/0	0/1	Negativa	
	Fazenda 5	0	0	0/1	Negativa	
	Fazenda 6	0/1	1/0	0	Negativa	
	Fazenda 7	1/1	1/1	0	Positiva	
	Fazenda 8	0	0	0/1	Inconclusiva	
	Fazenda 9	0	0	0/1	Inconclusiva	
	Fazenda 10	0	0	0	Inconclusiva	
	Cajari	Fazenda 11	0	0	0/1	Inconclusiva
		Fazenda 12	0	0	0/1	Inconclusiva
Fazenda 13		0	0	0	Inconclusiva	
Fazenda 14		0	0	0	Inconclusiva	
Fazenda 15		0	0	0	Inconclusiva	
Viana	Fazenda 16	0	0	0/1	Inconclusiva	
	Fazenda 17	0	0	0/1	Inconclusiva	
Parnarama	Fazenda 18	0	1/1	0	Positiva	
<b>Paraíba</b>						
Rio Tinto	Fazenda 23	0/1	0/1	0	Negativa	
Santa Rita	Fazenda 24	0/1	0/1	0	Negativa	
Capim	Fazenda 25	0/1	0/1	0	Negativa	
Sapé	Fazenda 26	0/1	0/1	0	Negativa	
<b>Bahia</b>						
São Sebastião do	Fazenda 30	0	0	0	Negativa	
Passé	Fazenda 32	0	0	0	Negativa	
Teodoro Sampaio	Fazenda 33	0	0	0	Negativa	
Alagoinha	Fazenda 34	0	0	0	Negativa	

## 5 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram identificados oito focos de paratuberculose o que permite inferir que a doença está se dispersando no Nordeste brasileiro, a exemplo do que está acontecendo no país com o rebanho bovino (YAMASAKI et al., 2013a, 2013b). O diagnóstico da paratuberculose em búfalos no Brasil foi realizado primeiramente no estado do Maranhão (BARBOSA et al., 2010) e no estado de Pernambuco (MOTA et al., 2010). A partir deste diagnóstico na região Nordeste do Brasil, entende-se que esta doença deve ser estudada em um nível mais amplo, abrangendo outros estados da região que apresenta um grande efetivo de bubalinos, principalmente o Maranhão.

Os exames pós-mortais e histológicos permitiram constatar que as lesões foram típicas de paratuberculose e a coleta de amostras para PCR e imuno-histoquímica, foram úteis para confirmar seis fazendas positivas. Os exames complementares clínicos como PCR e exame citológico, Ziehl-Nielsen de fezes, permitiu identificar dois focos. As oito amostras de leite obtidas para diagnóstico molecular não resultaram na amplificação de produto compatível com DNA de *Map*. Esse fato verificado pode ser explicado pela pequena quantidade de DNA presente no leite de búfalas infectadas, visto que foi coletado leite de criações da Baixada Maranhense com grande quantidade de búfalas com sinais clínicos compatíveis com paratuberculose. Portanto nessas criações o diagnóstico estabelecido foi inconclusivo. A região da Baixada Maranhense carece de mais investigação acerca da paratuberculose.

Os resultados obtidos no nosso estudo nos levam a sugerir que a paratuberculose no Brasil é tão importante para bovinos quanto para búfalos. Entretanto, durante o estudo se encontrou resistência por parte de alguns proprietários em admitir a ocorrência do problema nas propriedades e em aceitar a visita com a finalidade de investigar a doença. A partir do diagnóstico, o receio da difusão da informação era evidente. A tendência dos criadores é abater os animais doentes antes que a informação se propague e que o prejuízo aumente. Esse comportamento é prejudicial em virtude de camuflar a enfermidade no rebanho e diminuir as possibilidades de diagnóstico e controle, considerando que esta doença é crônica e de difícil erradicação.

Especialmente em 16 criações de búfalos deste estudo observou-se grande quantidade de búfalos com emagrecimento e diarreia. Essas criações, localizadas nas sub-regiões do Sacoã e Moco-roca nos municípios de Viana e Cajari, respectivamente da Baixada Maranhense são caracterizadas por grandes planícies baixas que alagam na estação das chuvas, criando enormes lagoas entre os meses de janeiro e julho (SILVA, 2012). Essas características geográficas parecem ser relacionadas com a dispersão de *Map* através da água e contaminação dos búfalos criados nessas regiões. Na Baixada Maranhense se concentram cerca de 70-90% dos búfalos do Maranhão (BERNARDI, 2005). Apesar desta atividade agropecuária possuir importância regional, os índices zootécnicos dos búfalos dessa região são ruins (SILVA, 2012). Constatou-se ainda nesta região a exploração extrativista, o que contribui para que o manejo sanitário seja ineficiente.

Nas criações de búfalos de Sacoã e Moco-roca os proprietários revelaram que a “surrilha”, nome popular atribuído à paratuberculose, é conhecida há cerca de cinco a seis anos. O primeiro relato de paratuberculose em búfalos no estado do Maranhão foi realizado por Barbosa et al., (2010) no município de São Mateus do Maranhão, uma região próxima da Baixada Maranhense; nesta propriedade havia se realizado compra de 60 vacas búfalas da Baixada Maranhense, dos municípios de Cajapió e São João Batista (dados obtidos com o proprietário durante visita).

Várias criações de Sacoã e Moco-roca foram destacadas das demais propriedades por não possuírem cercas, permitindo contato de búfalos com outros animais domésticos, silvestres e búfalos de outros criadores livremente. A bubalinocultura foi introduzida na Baixada

Maranhense no final dos anos 1950. Não houve planejamento social e ambiental desta atividade na região; não estão definidas oficialmente as áreas públicas e privadas e não se respeita a legislação ambiental. Esses fatores contribuem adicionalmente para conflitos entre bubalinocultores e os atuantes da atividade pesqueira artesanal (BERNARDI, 2005). Portanto nota-se que há prejuízos econômicos não somente devido à paratuberculose, mas também existem outros fatores como conflitos sociais e escassez de alimento na época seca do ano.

Notou-se durante este estudo que os criadores não possuem esclarecimentos acerca das atividades pecuárias e sofrem prejuízos de diversas origens. Pereira (2013) observou, durante estudo da pecuária bubalina em uma reserva extrativista denominada “RESEX VERDE PARA SEMPRE”, no estado do Pará, que a pecuária evoluiu de acordo com o conhecimento prático das famílias de pecuaristas. Portanto, atenção popular para esclarecimentos de doenças, fome e conflitos sociais devem ser preconizados principalmente para a região da Baixada Maranhense que sofre com prejuízos econômicos em decorrência da falta de conhecimentos técnicos sobre a atividade de bubalinocultura. Brito, et al. (2014) ressaltaram que a identificação de casos subclínicos de paratuberculose e medidas de controle desta enfermidade devem ser preconizadas.

Várias estratégias têm sido estudadas para o controle da infecção pelo *Map* em bovinos, entre estas se destacam modelos com testes sorológicos e abate de bovinos positivos, diferentes técnicas de manejo principalmente com relação à presença do bezerro com a vaca e práticas higiênico-sanitárias. No entanto o abate de bovinos positivos é adotado como a primeira ação em planos individuais de controle da doença, como iniciativa dos proprietários; esta ação tem sido amplamente discutida devido a ser uma estratégia não efetiva quando utilizada sozinha. Na prática observa-se que geralmente adotam-se intervalos insatisfatórios entre os testes sorológicos e a baixa sensibilidade dos exames adotados permite que diversos bovinos permaneçam nas fazendas continuamente dispersando *Map* (AL-MAMUN et al., 2016).

O prejuízo econômico decorrente da paratuberculose é destacado por alguns autores. De acordo com relatos do USDA (órgão oficial sobre questões agropecuárias dos Estados Unidos da América), 68% dos rebanhos de bovinos de leite daquele país possui pelo menos um bovino infectado pelo *Map* (NAHMS, 2007). Estimativas revelam que a doença de Johnes nos EUA causa uma perda de mais de 200 milhões de dólares para a indústria leiteira (OTT et al., 1999).

A natureza crônica da doença e o grande número de casos subclínicos em rebanhos positivos indicam que é necessário realizar acompanhamentos contínuos e longitudinais de alta qualidade para o entendimento da patobiologia e epidemiologia da paratuberculose (Schukken et al., 2015) e desse modo aplicar ações para o controle da infecção pelo *Map* em rebanhos.

O quadro clínico-patológico verificado nos bubalinos deste estudo foi semelhante aos anteriormente descritos na literatura em bubalinos no Brasil (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; DALTO et al., 2012) e também em outros países como na Índia (SIVAKUMAR et al., 2006; RAUT et al., 2003) e Itália (LILLINI et al., 1999), assim como em bovinos (CLARKE 1997; DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2007; 2009; FISS et al., 2015).

O diagnóstico diferencial de doenças de búfalos que cursam com diarreia e emagrecimento deve ser considerado, incluindo-se verminose, diarreias não infecciosas e doenças carenciais (deficiência de energia e proteína, deficiências minerais como cobre [condicionada ao excesso de molibdênio], cobalto e fósforo) (Tokarnia et al., 2010).

À necropsia, verminose em búfalos adultos, associado com emaciação e edema submandibular, foi um achado frequente nos animais. Verminose em bubalinos e bovinos adultos é rara e ocorre em situações de baixa imunidade como na deficiência de fósforo (TOKARNIA et al., 2010) e na paratuberculose. Contudo, alguns proprietários e técnicos reconhecem a verminose como um problema primário em seus rebanhos e incluem no



protocolo de manejo a vermifugação sistemática de animais adultos, o que implica em prejuízos econômicos indiretos, que pode ser atribuída à falta de informação sobre manejo sanitário.

Diarreia osmótica (não infecciosa) também pode ser observada em ruminantes quando, após semanas a meses de privação de alimento, os animais são realimentados, principalmente após rápida rebrota das forrageiras. Isso é comumente observado após secas prolongadas, com restrição de oferta de matéria seca, que leva à menor produção de ácidos graxos voláteis e, como consequência, ocorre atrofia das papilas ruminais (MALAFAIA, 2015). Na acidose ruminal também há diarreia osmótica, pois os produtos liberados durante a digestão dos carboidratos não estruturais aumentam a osmolaridade intra-ruminal (BROWN et al., 2007); nesses casos as enfermidades são agudas e diferem da evolução crônica da paratuberculose.

Nos búfalos deste estudo observou-se pelos arrepiados, despigmentados e foscros. Atribuímos essas alterações da pele ao grave comprometimento da mucosa intestinal na paratuberculose, em que há diminuição de absorção de nutrientes, diarreia e desidratação. O aspecto desbotado da pelagem de alguns búfalos nos faz sugerir que haja algum grau de deficiência de cobre secundária à paratuberculose e concomitante deficiência primária desse elemento, visto que em rebanhos do Maranhão há deficiência de cobre (MORAES et al., 1999; TOKARNIA et al., 2010). Nos búfalos deste estudo também foi encontrada hemossiderose em órgãos linfoides, o que fortalece a tese da deficiência de cobre. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Belo-Reis et al. (2016).

Na paratuberculose, em geral os animais se infectam nos primeiros meses de vida, sem apresentar sinais clínicos. A dispersão das bactérias pelas fezes ocorre alguns anos após a infecção inicial pelo *Map*, durante a fase clínica (STABEL, 2008). Portanto considera-se que os indivíduos adultos sejam os mais responsáveis pela disseminação dos BAARs ao ambiente (BUERGELT et al., 2004), entretanto um estudo no Canadá revelou que os bezerros também excretam *Map* pelas fezes e contribuem para disseminação dos bacilos, fortalecendo a hipótese de transmissão da doença pelos bezerros em fazendas de bovinocultura de leite (WOLF et al., 2015). A imaturidade dos macrófagos em animais jovens pode ser uma das causas da susceptibilidade à infecção (MOMOTANI et al., 1988). Embora a literatura historicamente afirmar que geralmente os bezerros raramente eliminam *Map* pelas fezes e a transmissão bezerro para bezerro tem importância menor. Portanto, ações de controle da paratuberculose devem preconizar a eliminação de ruminantes na fase clínica e subclínica da doença associado com adoção de boas práticas de manejo sanitário (BRITO et al., 2014).

A vacinação contra a paratuberculose tem sido considerada como uma estratégia alternativa para o controle da doença quando combinada com intervenções de manejo. O conhecimento das interações patógeno hospedeiro é extremamente importante para o desenvolvimento das vacinas. É conhecido que a resposta imune celular mediada por células Th1 desempenham um papel decisivo na proteção contra a infecção pelo *Map*. Entretanto estudos recentes sugeriram que as respostas imunes inatas são mais importantes que a imunidade adaptativa (PARK & YOO, 2016). Estão em desenvolvimento vacinas que utilizam cepas vivas atenuadas de *Map*; com o auxílio de estudos genômicos e de modelos de bioinformática; essas pesquisas são promissoras para o futuro (BANNANTINE & TALAAT, 2015). Não existem vacinas disponíveis contra a paratuberculose, portanto essa ferramenta deve ser considerada como uma medida de controle a longo prazo. Ainda assim, em uma região de tamanha precariedade como é o caso da Baixada Maranhense, as perspectivas de utilização dessa tecnologia não são realistas. Pois nem mesmo medidas de controle básicas são de fácil implantação, visto que o sistema de manejo extrativista, os problemas socioeconômicos e as características especiais do ecossistema dificultam a implantação de boas práticas de manejo sanitário.

O leite de matrizes infectadas para suas crias é conhecido como rota de transmissão (STABEL, 2008). Em bubalinos, o uso de “ama de leite” (DALTO et al., 2012), o acesso



coletivo dos búfalos a áreas alagadas e a contaminação de alimentos e água com fezes de animais infectados são fatores que facilitam a dispersão do *Map*. Além disso, o desconhecimento da doença, o comércio não regulamentado de animais e a falta de um programa de controle voltado para a realidade da região facilitam a disseminação do agente e contribuem para o crescente número de focos. Convém alertar para o risco do consumo de produtos contaminados que são comercializados para o consumo humano, em face do potencial zoonótico do *Map* e da provável relação com a doença de Crohn (ATREYAA et al., 2014).

Além das comunicações da doença de Johne em búfalos no Maranhão e Pernambuco (MOTA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010), outros diagnósticos foram realizados em bovinos leiteiros em Pernambuco (MOTA et al., 2007), na Paraíba (OLIVEIRA et al., 2008; MOTA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2012b) e em ovinos e caprinos (OLIVEIRA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2012a) na Paraíba. Este trabalho revela que a exemplo do que ocorre em outras espécies de ruminantes, a doença está se disseminando em búfalos na região Nordeste do Brasil e ressalta-se a importância das pesquisas sobre identificação de animais subclínicos (YAMASAKI et al., 2013a) e o controle da paratuberculose. Ações efetivas são necessárias para esclarecer a situação epidemiológica da paratuberculose no Brasil e subsidiar ações de controle desta doença, especialmente na região da Baixada Maranhense.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou a identificação de oito focos de paratuberculose em búfalos na região Nordeste do Brasil.

A enfermidade está se dispersando nesta região com dimensões semelhantes ao que se verificou em bovinos.

O presente estudo possibilitou o entendimento, através do comércio não regulamentado de búfalos, que a doença se disseminou a partir da Baixada Maranhense para as outras regiões estudadas como Parnarama, MA, São Mateus do Maranhão, MA e para o estado de Alagoas.

A paratuberculose em búfalos nos focos estudados não diferiu das lesões descritas em bovinos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACYPRESTE, C. S.; JULIANO, R. S.; RIVEIRA, F. E. B.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S. & DIAS-FILHO, F. C. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 55-59, 2005.
- Alhagamhmad, M. H., Day, A. S., Lemberg, D. A., Leach, S. T. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology*, [Epub ahead of print]
- AL-MAMUN, M. A.; SMITH, R. L.; SCHUKKEN, Y. H.; GRÖHN, Y. T. Modeling of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dynamics in a dairy herd: an individual based approach. **Journal of Theoretical Biology**, v. 408, p. 105-117, 2016.
- ATREYAA, R.; BÜLTEB, M.; GERLACH, G.F.; GOETHED, R.; HORNEF, M.W.; KÖHLER, H.; MEENS, J.; MÖBIUS, P.; ROEB, E.; WEISS, S. Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 858-867, 2014.
- BANNANTINE, J. P.; TALAAT, A. M. Controlling Johne's disease: vaccination is the way forward. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1-2, 2015.
- BANNANTINE, J. P.; ZHANG, Q.; LI, L. L.; KAPUR, V. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. **BMC Microbiology**, v. 3, p.10, 2003.
- BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; SILVEIRA, J. A. S.; ALBERNAZ, T. T.; SILVA, N. S.; REIS, A. S. B.; OLIVEIRA, C. H. S.; YAMASAKI, E. M. 2010. Paratuberculosis in water buffaloes (*Buballus bubalis*) in Maranhão State, Brazil. In: Proceedings of the 26<sup>th</sup> World Buiatrics Congress. Santiago, Chile.
- BARROS, C. S. L.; FIGHERA, R. A.; ROZZA, D. B.; RECH, R. R.; SALLIS, S. V.; LANGOHR, I. M. Doença granulomtosa sistêmica em bovinos no Rio Grande do Sul associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia* spp.). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 162-171, 2001.
- BERNARDI, C. C. Conflitos Sócio-Ambientais Decorrentes da Bubalinocultura em Territórios Pesqueiros Artesanais: O Caso Olinda Nova do Maranhão. 216 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental), Universidade Católica de Brasília, 2008.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acessado em 10/10/2016.
- BRITO, M.F.; MOTA, R.A.; YAMASAKI, E.M. Paratuberculose: perguntas e respostas. <http://institucional.ufrj.br/sap/files/2014/12/cartilha-PARATUBERCULOSE-Perguntas-e-Respostas-out-2014.pdf>. 2014.

- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. The alimentary system. In: MAXIE M.G., (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5<sup>th</sup> Edit. Vol.2, Elsevier Saunders, Philadelphia, pp.1–296. 2007.
- BEGG, D. J.; WHITTINGTON, R. J. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 2, p. 129–145, 2007.
- BELO REIS A. S.; BRITO M. F.; BEZERRA JR. P. S.; FONSECA JR A. A.; UBIALI D. G.; MOTA R.A.; LEITE R.C.; BARBOSA J.D. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 823-828, 2015.
- BELO REIS, A. S.; SALVARANI, F.M.; BRITO, M. F.; FONSECA JUNIOR, A. A.; SILVA, N. S.; SILVEIRA, J. A. S.; REIS, J. K. P.; SILVA, J. B.; OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D. Intrauterine infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, v. 5, p. 1-3, 2016.
- BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. Paratuberculosis: Organism, disease, control. CAB international, Cambridge. 375p. 2010.
- BUERGELT, C. D.; BASTIANELLO, S. S.; MICHEL, A. L. Paratuberculosis. In: COETZER JAW & TUSTIN R.C. (Eds) **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press Southern Africa. 2<sup>nd</sup> ed. Vol 3. 2004.
- CARVALHO, I. A. **Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subspécie *paratuberculosis* (*Map*) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa, MG**. 54 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de Viçosa, 2008.
- CASTELLANOS, E.; ARANAZ, A.; BUCK, J. Rapid identification and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 locus. **Journal of Clinical Microbiology**, 48(4):1474-1477. 2010.
- CLARKE, C.J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, p. 217-261. 1997.
- CLARKE, C. J.; LITTLE, D. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. **Journal of Comparative Pathology**, 114(4):419-437. 1996.
- CLARKE, R. G.; GRIFFIN, J. F. T.; MACKINTOSH, C. G. Johne's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*): an histopathological grading system and comparison of paucibacillary and multibacillary disease. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58 p. 90-97, 2010.
- CLARKE, R. G.; GRIFFIN, J. F. T.; MACKINTOSH, C. G. Modification to histopathological lesion severity score in red deer (*Cervus elaphus*) affected by Johne's disease **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59 p. 261-262. 2011.

- COLLINS, M. T.; GARDNER, I. A.; GARRY, F. B.; ROUSSEL, A. J.; WELLS, S. J. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 229 p. 1912-1919. 2006.
- CORPA, J. M.; GARRIDO, J.; GARCÍA MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 255-265, 2000.
- COUSSENS, P. et al. Host pathogen interactions and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International. 2010. Cap. 11.
- CUNHA, P. H. J. et al. Avaliação microbiológica e anatomopatológica da paratuberculose bovina: relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003. Botucatu. **Anais...** Botucatu [s.n], 2003, p.118.
- DACORSO-FILHO, P.; CAMPOS, I. O. N.; FARIA, J. F.; LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 3, p. 129-139, 1960.
- DALTO, A. C.; BANDARRA, P. M.; PAVARINI, S. P.; BOABAID, F. M.; BITENCOURT, A. P. G.; GOMES, M. P.; CHIES, J.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, 44:1-5. 2012.
- DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from humans and animal sources. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2572-2577. 2000.
- DOUARRE, P. E.; CASHMAN, W.; BUCKLEY, J.; COFFEY, A.; O'MAHONY, J.M. Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. **Gut Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2010.
- DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 109-115. 1999.
- DUPONT, O. 1915. Jornal do Comércio do Rio de Janeiro de 5.11.1915.
- FISS, L.; SANTOS, B. L.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; MOTA, R. A.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M. L.; SOARES, M. P.; SCHILD, A. L. Paratuberculose em bovinos de corte na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 437-442, 2015.
- FONSECA, L. F. L.; OLIVAL, A. A.; PEREIRA, C. C.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; SANTOS, M. V. Identificação de anticorpos anti-

*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 51-56, 2000.

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, n. 22, 1989.

HENDRICK, S. H.; KELTON, D. F.; LESLIE, K. E.; LISSEMORE, K. D.; ARCHAMBAULT, M.; DUFFIELD, T. F. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 1302-1308. 2005.

IMIRZALIOGLU, C.; DAHMEN, H.; HAIN, T.; BILLION, A.; KUENNE, C., CHAKRABORTY, T.; DOMANN, E. Highly specific and quick detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1843-1852. 2011.

JACINTHO, A. P. P. et al. Paratuberculose em caprino. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2009. Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia** (s.n), 2009. CD-ROM.

KALIS, C. H.; COLLINS, M. T.; HESSELINK, J. W.; BARKEMA, H. W. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: The Johnin skin test and the gamma interferon assay. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 73-86. 2003.

KAUR, P.; FILIA, G.; SINGH, S. V.; PATIL, P. K.; RAVI-KUMAR, G. V.; SANDHU, K. S. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India. **Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Disease**, v. 34, p. 163-169, 2011.

KRÜGER, C. KÖHLER, H.; LIEBLER-TENORIO, E. M. Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, p. 33-45, 2015.

KRUZE, J.; SALGADO, M.; PAREDES, E.; MELLA, A.; COLLINS, M. T. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 476-479, 2006.

LILLINI, E.; GAMBERALE, F.; GUARDO, G.; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Central Italy. In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne, Australia, 254. 1999.

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

- MALAFAIA, P. 2015. Comunicação pessoal. Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- MEDEIROS, J. M. A.; GARINO JR, F.; ALMEIDA, A. P.; LUCENA, E. A.; RIET-CORREA, F. Paratuberculose em ovinos e caprinos no estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 111-115, 2012a.
- MEDEIROS, J. M. A.; GARINO JR, F.; MATOS, R. A. T.; COSTA, V. M. M.; RIET-CORREA, F. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 697-700, 2012b.
- MOMOTANI, E.; ROMONA, N.M.; YOSHIHARA, K.; MOMOTANI, Y.; HORI, M.; OZAKI, H.; EDA, S.; IKEGAMI, M. Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 1-2, p. 55-68, 2012.
- MOMOTANI, E. et al. Role of M-cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches of calves. **Veterinary Pathology**, v. 25, p. 131-137, 1988.
- MORAES, S. S.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 19-33, 1999.
- MOTIWALA, A. S.; LI, L.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. Current understand of genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Microbiology Infectious**, v. 8, p. 1406-1418, 2006.
- MOTA, P. M. P. C.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; SALVARANI, F. M.; LEITE, R. M. H.; DIAS, L. D.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; GUEDES, R. M. C.; LAGE, A. P. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a state of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 703-706, 2009.
- MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; MEDEIROS, E. S.; COSTA, M. M.; PEIXOTO, M. P.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 237-242, 2010.
- MOTA, R. A.; PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; GOMES, M. J. P.; PEIXOTO, R. M.; MAIA, C. L.; BRITO, M. F.; CHIES, J. A. B.; SNEL, G. G. M.; BERCHT, S.; JUFFO, G. D. 2007. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74:73-79.
- NAHMS, 2007. Dairy 2007 – Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991–2007. National Animal Health Monitoring System, FortCollins, CO.
- NIELSEN, S. S.; TOFT, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 217-235, 2008.

OIE 2015. Disponível em: <http://www.oie.int>. World Organization for Animal Health. Acessado em 15 ago. 2015.

OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; RODRIGUES, T. A.; DANTAS, A. F. M.; MIRANDA-NETO, E. G.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. (CD-Rom). 2008.

OLIVEIRA, D. M.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G. J. N.; ASSIS, A. C. O.; DANTAS, A. F. M.; BANDARRA, P. M.; GARINO JR, F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 67-72.

OTT, S. L.; WELLS, S. J.; WAGNER, B. A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p. 179–192, 1999.

PARK, H. T., YOO, H. S. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 5, p. 108-116, 2016.

PAVARINI, S. P.; BEZERRA JUNIOR, P. S.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; DRIEMEIER, D. Achados clínico-patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 611-616, 2008.

PEREIRA, L. B. **Evolução da pecuária bubalina e a transformação dos ecossistemas na resex verde para sempre: um olhar a partir da análise retrospectiva**. 179 p. 2013. Dissertação (Pós-Graduação em Agriculturas Amazônicas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

PITHUA, P.; GODDEN, S. M.; WELLS, S. J.; STABEL, J. R. Evaluation of the risk of paratuberculosis in adult cows fed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA-positive or negative colostrums as calves. **Am. J. Vet. Res.** v. 72, p. 1456-1464, 2011.

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. **O Biológico**, v. 4, p. 19-24, 1979.

RAUT, A.; MANJU, A.; KUMAR, B.; SETHI, R. K., **Prevalence of paratuberculosis in breeding buffalo bulls at organized farms**. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> Asian Buffalo Congress on Buffalo for Food Security and Rural Employment, New Delhi, India, 18. 2003.

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; MENDEZ, M. DEL C.; SCHILD, A. L. Poluição ambiental como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 4, p. 107-114, 1983.

RISTOW, P.; MARASSI, C. D.; RODRIGUES, A. B.; OELEMANN, W. M.; ROCHA, F.; SANTOS, A.S.; CARVALHO, E. C.; CARVALHO, C. B.; FERREIRA, R.; FONSECA,



- L. S.; LILENBAUM, W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 432-434, 2007.
- RIVERA, F. E. B. **Levantamento sorológico utilizando-se a técnica ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose.** In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL, 1996. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: [s.n.], 1996. p. 20-22.
- ROHDE, K. H.; ABRAMOVITCH, R. B.; RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. **Cell Host and Microbe**, v. 2, p. 352-364, 2007.
- SCOTT M.C.; BANNANTINE J.P.; KANEKO Y.; BRANSCUM A.J.; WHITLOCK R.H.; MORI Y.; SPEER C.A. & EDA S. 2010. Absorbed EVELISA: A diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborn Pathog. Dis.* 7(11):1291-1296.
- SCHUKKEN, I. H.; WHITLOCK, R. H.; WOLFGANG, D.; GROHN, Y.; BEAVER, A.; VANKESSEL, J.; ZURAKOWSKI, M.; MITCHELL, R. Longitudinal data collection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in dairy herds: the value of precise field data. *Veterinary Research*. v. 46, p. 65-76, 2015
- SEVILLA, I.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.; JUSTE, R. A. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 18-32, 2007.
- SILVA, N. M. Estudos sobre a paratuberculose. II. Isolamento da amostra de *Mycobacterium paratuberculosis* em meio de Hohn. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 4, p. 175-178, 1961.
- SILVA, E. B. **Diagnóstico de paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil.** 60p. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Pará, Castanhal, 2005.
- SILVA, A. R. **A Nova Regionalização do Maranhão: implicações a partir da implantação das 32 regiões de planejamento.** 19p. I Seminário de Desenvolvimento Regional, Estado e Sociedade, Rio de Janeiro, 2012.
- SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B.N.; SINGH, N.; SHARMA, A.K. Pathology of naturally occurrence paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 455-462, 2006.
- STABEL, J. R. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 375-380, 1997.
- STABEL, J. R. Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control.** Cambridge: CAB International, cap. 21. 2010.

- STABEL, J.R. Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3600-3606, 2008.
- TADDEI, R., BARBIERI, I., PACCIARINI, M.L., FALLACARA, F., BELLETTI, G.L., ARRIGONI, N. 2008. *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 338-347, 2008.
- TIMMS, V. J.; GEHRINGER, M.M.; MITCHELL, H.M.; DASKALOPOULOS, G.; NEILAN, B. A. Review. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 1-8, 2011.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; BARBOSA, J. D.; BRITO, M. F.; DÖBEREINER, J. Deficiências minerais em animais de produção. Helianthus, Rio de Janeiro, 191p. 2010.
- VANSNICK, E.; RIJK, P.; VERCAMMEN, F.; GEYSEN, D.; RIGOUTS, L.; PORTAELS, F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 197-204, 2004.
- WEBSTER, J. D.; MILLER, M.A.; DUSOLD, D.; RAMOS-VARA, J. Effects of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 3, p. 529-535, 2010.
- WHITTINGTON, R. J.; WINDSOR, P. A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 60-69, 2009.
- WOLF, R.; ORSEL, K.; DE BUCK, J.; BARKEMA H. W. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. **Veterinary Research**, v. 46, p. 71-79, 2015.
- YAMASAKI, E. M.; TOKARNIA, C. H.; GALVÃO, A.; GOMES, M. J. P.; CHIES, J. A. B.; VEIT, T. D.; ARAGÃO, A. P.; BRITO, M. F. Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 921-932, 2010.
- YAMASAKI, E.M.; BRITO, M.F.; MCINTOSH, D.; GALVÃO, A.; PEIXOTO, T.C.; TOKARNIA C.H. Diagnóstico imuno-histopatológico da paratuberculose subclínica em bovinos no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1427-1432, 2013a.
- YAMASAKI, E.M.; BRITO, M.F.; MOTA, R.A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C.H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 127-140, 2013b.

## **8 ANEXOS, 3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

# *Paratuberculosis in buffaloes in Northeast Brazil*

**Marilene de Farias Brito, Alessandra dos Santos Belo-Reis, José Diomedes Barbosa, Daniel Guimarães Ubiali, Ana Paula de Castro Pires, et al.**

**Tropical Animal Health and  
Production**

ISSN 0049-4747

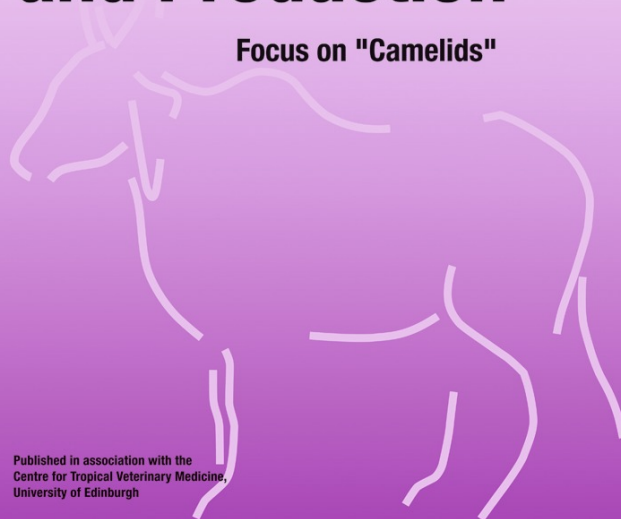
Trop Anim Health Prod  
DOI 10.1007/s11250-016-1100-z

Volume 48 · Number 5 · June 2016

**ONLINE  
FIRST**

## **Tropical Animal Health and Production**

Focus on "Camelids"



Published in association with the  
Centre for Tropical Veterinary Medicine,  
University of Edinburgh

 Springer

 Springer

**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



## Paratuberculosis in buffaloes in Northeast Brazil

Marilene de Farias Brito<sup>1</sup> · Alessandra dos Santos Belo-Reis<sup>2</sup> · José Diomedes Barbosa<sup>2</sup> · Daniel Guimarães Ubiali<sup>1</sup> · Ana Paula de Castro Pires<sup>1</sup> · Elizabeth Sampaio de Medeiros<sup>3</sup> · Renata Pimentel Bandeira de Melo<sup>3</sup> · Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque<sup>3</sup> · Elise Yamasaki<sup>3</sup> · Rinaldo Aparecido Mota<sup>3</sup>

Received: 12 February 2016 / Accepted: 13 June 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** Several farms in the Northeast of Brazil were investigated for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in order to identify the occurrence of paratuberculosis in buffaloes. Samples were obtained from 17 farms, two slaughter houses, and a quarantine area in the Northeast. About 15,000 buffaloes of the Murrah, Mediterranean, and Jafarabadi breed as well as their crossbreeds were evaluated for meat, dairy, and mixed farms with semi-intensive or extensive breeding practices. For diagnostic purposes, postmortem and histopathological examination, including Ziehl-Neelsen test of fecal smears and scraped intestinal mucosa were performed. PCR was applied for fecal samples, mesenteric lymph nodes, and intestines. Six Johne's disease-positive farms, which together with those previously identified, indicate that the disease is spread through the Brazilian Northeast, similar to what occurs in cattle herds in other regions of the country. The increase in prevalence of paratuberculosis is a consequence of introduction of animals from other regions without adequate veterinary assistance and due to the little official attention paid to this initially silent and chronic disease.

**Keywords** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* · Johne's disease · Ruminants · Water buffalo · Pathology · Molecular diagnostics

### Introduction

The occurrence of paratuberculosis (Johne's disease) was first documented in Brazil in the State of Rio de Janeiro by Dupont in 1915. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is the etiologic agent which produces chronic granulomatous enteritis in ruminants. Paratuberculosis has been recorded from 12 Brazilian states in buffalo, cattle, sheep, and goats (Yamasaki et al. 2013b). Strategies for control of the disease in the country are insufficient, and economic losses are underestimated (Brito et al. 2014). The disease has formally been reported in buffaloes in Pernambuco (Mota et al. 2010), Maranhão (Barbosa et al. 2010), and Rio Grande do Sul (Dalto et al. 2012). It is crucial to intensify epidemiological studies in the northern and northeastern regions of the country where the number of buffaloes is significant. The objective of this paper is to report farms positive for paratuberculosis in the Northeast Brazil.

✉ Marilene de Farias Brito  
marilene@ufrj.br

<sup>1</sup> Setor de Anatomia Patológica, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR465 Km7, Seropédica, RJ 23891-000, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Diagnóstico Veterinário, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Centro, Castanhal, PA 68740-080, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 51171-900, Brazil

### Material and methods

About 15,000 beef and dairy Murrah Mediterranean and Jafarabadi buffaloes and their crossbreeds were examined. Extensively and poorly managed herds were investigated as well as those raised under semi-intensive conditions, with reasonable management but excellent animal performance. Seventeen beef or dairy farms in Maranhão, Paraíba, Alagoas, and Bahia, and two slaughterhouses in Pernambuco were visited in order to identify cases of paratuberculosis. Samples from a quarantine



area in Ceará were also obtained for histopathological exam. Necropsies were performed on 26 buffaloes that were euthanized according to the euthanasia guidelines recommended by Normative Resolution No. 13 of September 20, 2013 from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The samples obtained were fixed in 10 % formalin, routinely processed, and stained with hematoxylin and eosin (H&E); lesions suggestive of paratuberculosis were Ziehl-Neelsen (ZN) stained. Swabs of ileal mucosa scrapings, fecal smears, and mesenteric lymph node imprints were performed, fixed in methanol, and ZN stained (Bartlett 2013).

Fecal samples and fragments of mesenteric lymph nodes, ileum and cecum, removed with a sterile scalpel, were placed into Eppendorf polyethylene tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for processing. DNA extraction was performed on stool samples with QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®). DNeasy Blood and Tissues (Qiagen®) kit was applied to the tissue samples according to the manufacturer. The DNA obtained was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to amplification. The F57 insertion sequence was used to detect *Map* DNA. Amplification of the *Map* DNA was performed using the primers F57 (5'-CCTGTCTAATTCGATCACGGACTAGA-3') and F57Rn (5'-TGGTGTACCGAATGTTGTTGTCAC-3') (Vansnick et al. 2004). The reactions were prepared in 200- $\mu\text{L}$  microcentrifuge tubes with a final volume of 12.5  $\mu\text{L}$  containing 2.5  $\mu\text{L}$  of genomic DNA, 0.5  $\mu\text{L}$  of each agent specific primer at a concentration of 10 pmol, 2.75  $\mu\text{L}$  of Milli-Q ultrapure water, and 6.25  $\mu\text{L}$  of MasterMix (Qiagen® PCR mixture), according to the manufacturer. The PCRs were performed in a thermocycler (XP Thermal Cycler—Bioer Technology Co. Ltd) using the following steps according to Vansnick et al. (2004): denaturation of the initial DNA at  $94^{\circ}\text{C}$  for 4 min, 40 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 45 s for denaturation,  $68^{\circ}\text{C}$  for 45 s for annealing and  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s for extension, with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Positive controls consisted of previously studied cattle samples, and the negative control consisted of ultrapure water. The analysis of the amplified 424-base pair (bp) product, corresponding to the *Map* DNA was performed by electrophoresis using a 1.5 % agarose gel stained with Blue Green dye (LGC Biotecnologia), which

was visualized with ultraviolet light and photographed. We used a standard molecular weight of 100 bp (Fermentas).

## Results

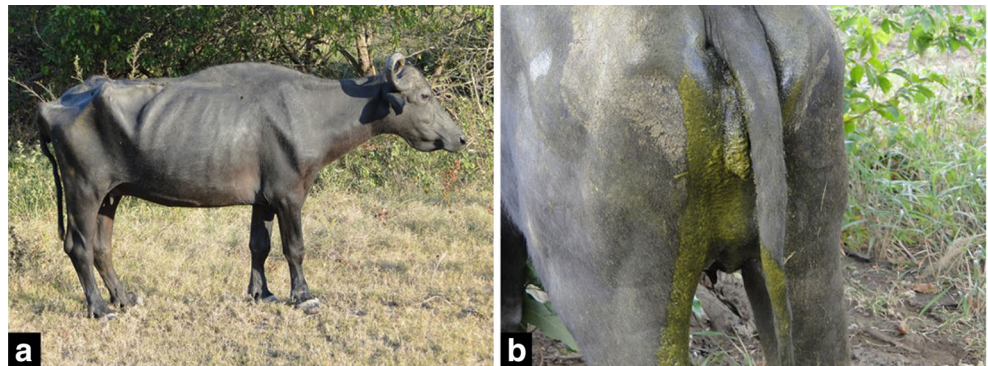
Six buffalo herds with paratuberculosis infection were identified, five of which were located in the state of Maranhão and one in Alagoas. All positive herds exhibited clinical signs of the disease characterized by progressive weight loss, submandibular edema (Fig. 1a), foamy dark green liquid diarrhea (Fig. 1b), unresponsiveness to antimicrobial therapy, tenesmus, rough and depigmented coat, dehydration, weakness, and finally death. The body score of the sick buffaloes ranged from 1 to 3 (scale 1–5), which generally segregated from the herd.

Concomitant diseases were identified in these herds, such as infection by gastrointestinal nematodes in adult buffaloes, reproductive disorders, and mastitis. In general, the owners were not familiar with symptomatology of paratuberculosis and things of other causes such as changes in diet, ingestion of foreign bodies, and “worms.” After observing buffalo weight loss, some owners sent them to the slaughter house.

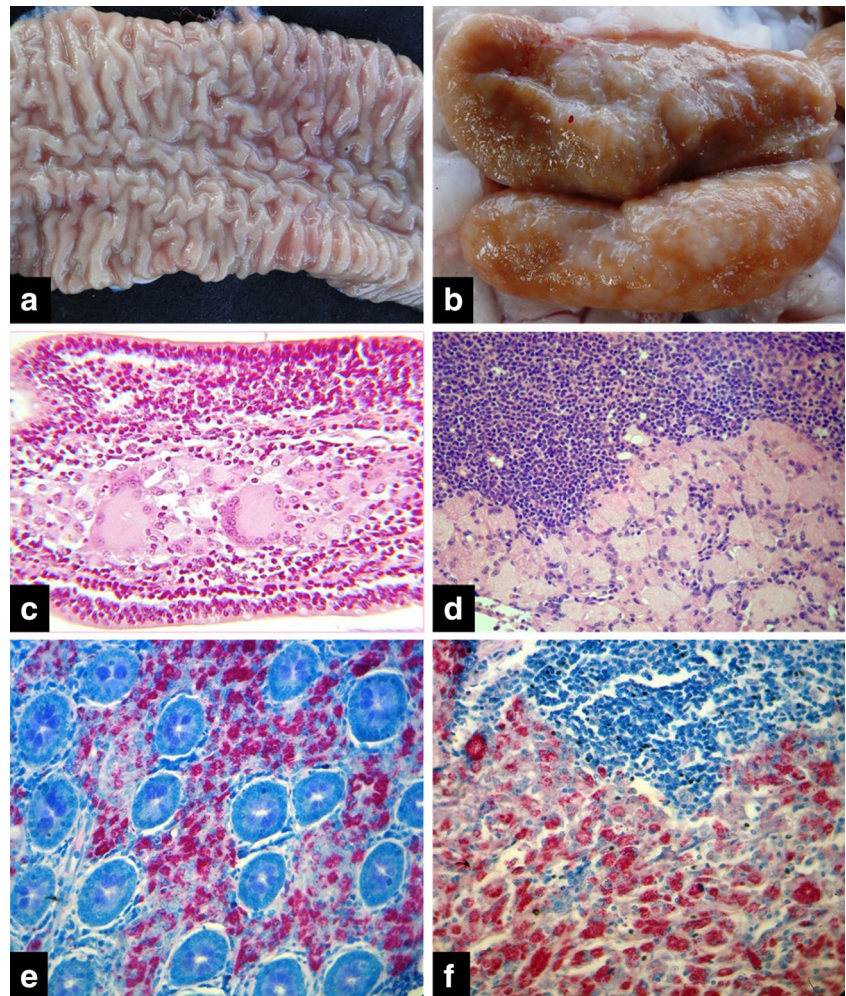
The buffaloes had collective access to wetland areas, where they remained crowded for long periods. Several buffalo calves were fed collectively through “communal nursing” by one buffalo cow. The histories provided by the owners unanimously confirm free trade of buffaloes in northeastern Brazil. One common practice in the region was the purchase of groups of lean buffalo from the lowlands of Maranhão for fattening.

From necropsies performed on 26 buffaloes of five farms and two municipal slaughterhouses, 10 of which originating from four farms were affected with paratuberculosis. The clinical signs and lesions were typical and consisted of emaciation, submandibular and cavity edema, thickening of the intestinal wall associated with mucosal roughness (Fig. 2a) and foamy liquid intestinal content, swelling of the mesenteric lymph nodes (Fig. 2b), and mesenteric and intestinal lymphangiectasy. Enteritis (Fig. 2c) and diffuse and pronounced granulomatous lymphadenitis

**Fig. 1** Buffaloes from Northeastern Brazil with paratuberculosis. **a** Severe weight loss, (body score 1) and submandibular edema. **b** Dark green diarrhea



**Fig. 2** Buffaloes from Northeastern Brazil with paratuberculosis. **a** Thickened and wrinkled ileal mucosa. **b** Swollen mesenteric lymph node with whitish and irregular areas. **c** Granulomatous enteritis with epithelioid cells and multinucleated giant cells, H&E, Obj.40×. **d** Granulomatous lymphadenitis with a large number of epithelioid cells and multinucleated giant cells, H&E, Obj.25×. **e** Alcohol-acid-resistant bacilli in the small intestinal mucosa, Ziehl-Neelsen, Obj.25×. **f** Alcohol-acid-resistant bacilli in the mesenteric lymph node, Ziehl-Neelsen, Obj.25×



(Fig. 2d) with a large quantity of epithelioid macrophages and multinucleated giant cells were found in those ten buffaloes. In eight buffaloes, Ziehl-Neelsen staining revealed alcohol-acid-resistant bacilli in histologic sections of the intestinal mucosa (Fig. 2e), mesenteric lymph nodes (Fig. 2f) and/or in scrapings of the ileal mucosa (Fig. 3a), in fecal smears (Fig. 3b), and mesenteric lymph node imprints. Moderate hemosiderosis was found in the mesenteric lymph nodes of buffaloes from the five positive herds of Maranhão.

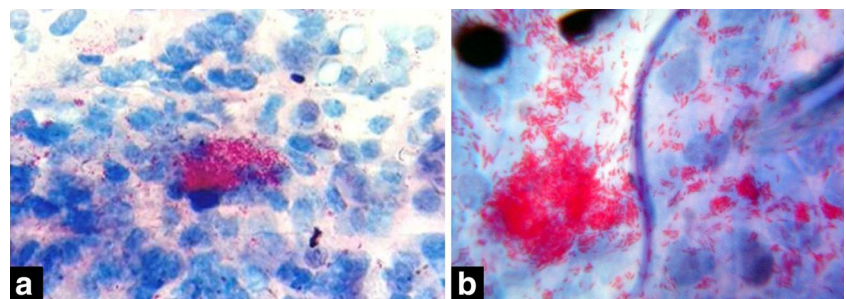
*Map* DNA was amplified from buffaloes in six of the 16 farms from where originated PCR samples. From those

positive farms, two were identified through feces samples by PCR, and four farms were identified through samples taken from feces, the ileum, and mesenteric lymph nodes.

## Discussion

Our studies in buffaloes revealed that the dissemination of *Map* is occurring in the same way as it occurs with cattle (Yamasaki et al. 2013b). Resistance to accept the diagnosis of paratuberculosis in the Northeast occurred from several owners of buffaloes herds,

**Fig. 3** Buffaloes from Northeastern Brazil with paratuberculosis. **a** Alcohol-acid-resistant bacilli in ileal mucosal scraping, Ziehl-Neelsen, Obj.100×. **b** Alcohol-acid-resistant bacilli in fecal smear, Ziehl-Neelsen, Obj.100×





who did not want to admit that the problem was occurring on their farm nor to accept a visit to investigate the disease. Owners had fear that the information about the disease on their farm would be disseminated; they prefer to slaughter buffaloes in bad conditions. This behavior does not favor the early diagnosis disease in the herd and its control, what is problematic, because paratuberculosis is a chronic disease and difficult to eradicate.

The clinical-pathological picture observed in buffaloes of this study was similar to the one already described by others in the specie (Sivakumar et al. 2006; Mota et al. 2010; Barbosa et al. 2010; Dalto et al. 2012) and in cattle (Driemeier et al. 1999; Mota et al. 2007, 2009; Yamasaki et al. 2013a; Fiss et al. 2015). The differential diagnosis for buffalo paratuberculosis are diseases with diarrhea and weight loss, including gastrointestinal nematodes, non-infectious diarrhea, and nutritional deficiency diseases. As observed by Belo-Reis et al. (2016), this study revealed buffaloes with rough and depigmented coat and hemosiderosis of lymph nodes, indicating copper deficiency.

Action should be taken to control paratuberculosis by eliminating ruminants in clinical stage of the disease. The adoption of good health management practices has been found to be most effective for control of the disease (Brito et al. 2014). Vaccine is being developed with live-attenuated strains of *Map*, and genomics and bioinformatics are promising research areas for future control of the disease (Bannantine and Talaat 2015).

Collective use of wetlands by buffaloes and the contamination of water and food with infected feces as well as the use of “communal nursing” favor the spread of *Map* (Dalto et al. 2012). According to the literature, calves rarely eliminate *Map*, so that calf-to-calf transmission is less important. However, a recent study showed *Map* excretion in feces by calves, strengthening the hypothesis of transmission through calves in dairy cattle farms (Wolf et al. 2015).

The little knowledge about the disease, free trade of animals, and lack of a control program favor the spread of *Map* and contribute to an increasing number of affected herds. It is important to warn buyers of the risk to consume contaminated products, given the zoonotic potential of *Map* and its likely relationship with Crohn's disease (Atreyaa et al. 2014).

Diagnosis of Johne's disease has been established in buffaloes in Maranhão and Pernambuco (Barbosa et al. 2010; Mota et al. 2010), in dairy cattle in Pernambuco (Mota et al. 2007) and Paraíba (Oliveira et al. 2008; Mota et al. 2009; Medeiros et al. 2012b), as well as in sheep and goats in Paraíba (Oliveira et al. 2010; Medeiros et al. 2012a). This study reveals that similar to its spread to other ruminant species, paratuberculosis is spreading in buffaloes of Northeast Brazil. Longitudinal and continuous data of high quality obtained are essential to understand the pathobiology and epidemiology of *Map* infection in herds (Schukken et al. 2015). This underscores the importance of studies aimed to control paratuberculosis, particularly to identify subclinical animals.

**Acknowledgments** The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq) for the financial support while performing the postdoctoral scholarship senior (PDS) via Call Notice CNPq/MAPA/SDA no. process 150259/2013-1, the veterinarians Mauro Gonçalves, Débora Rochelli, and André Santos for their support during the work, and to Leticia Pinto for helping with the laboratory tests.

#### Compliance with ethical standards

**Statement of animal rights** All the rural producers were informed about the utilization of their animals/samples during this investigation, consent was obtained, and the investigation adhered to a high standard of veterinary care.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Atreyaa, R., Bülteb, M., Gerlach, G.F., Goethed, R., Hornef, M.W., Köhler, H., Meens J., Möbius, P., Roeb, E. and Weiss, S. 2014. Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, International Journal of Medical Microbiology, 304, 858–867
- Bannantine, J.P. and Talaat, A.M. 2015. Controlling Johne's disease: vaccination is the way forward, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5:1–2
- Barbosa, J.D., Oliveira, C.M.C., Silveira, J.A.S., Albernaz, T.T., Silva, N.S., Reis, A.S.B., Oliveira, C.H.S. and Yamasaki, E.M. 2010. Paratuberculosis in water buffaloes (*Buballus bubalis*) in Maranhão State, Brazil. In: Proceedings of the 26th World Buiatrics Congress, Santiago, Chile, 334
- Bartlett, J.H. 2013. Microorganisms. In: Suvarna, S.K., Layton, C., and Bancroft, J.D. (eds), Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 17th ed. (Churchill Livingstone Elsevier, London), 296–298
- Belo-Reis, A.S., Brito, M.F., Bomjardim, H.A., Faial, K.C.F., Salvarani, F.M., Ubiali, D.G., Oliveira, C.M.C. and Barbosa J.D. 2016. Teores de cobre, zinco e ferro no fígado de búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose, Pesquisa Veterinária Brasileira, 36, 24–28
- Brito, M.F., Mota, R.A. and Yamasaki, E.M. 2014. Paratuberculose: perguntas e respostas. Universidade Federal Rural de Pernambuco. <http://institucional.ufrj.br/sap/files/2014/12/cartilha-PARATUBERCULOSE-Perguntas-e-Respostas-out-2014.pdf>
- Dalto, A.C., Bandarra, P.M., Pavarini, S.P., Boabaid, F.M., Bitencourt, A.P.G., Gomes, M.P., Chies, J., Driemeier, D. and Cruz, C.E.F. 2012. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes, Tropical Animal Health and Production, 44:1–5
- Driemeier, D., Cruz, C.E.F., Gomes, M.J.P., Corbellini, L.G., Loretto, A.P. and Colodel, E.M. 1999. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul, Pesquisa Veterinária Brasileira, 19, 109–115
- Fiss, L., Santos, B.L., Albuquerque, P.P.F., Mota, R.A., Marcolongo-Pereira, C., Adrien, M.L., Soares, M.P. and Schild, A.L. 2015. Paratuberculose em bovinos de corte na região Sul do Rio Grande do Sul, Pesquisa Veterinária Brasileira, 35, 437–442
- Medeiros, J.M.A., Garino Jr, F., Almeida, A.P., Lucena, E.A. and Riet-Correa, F. 2012a. Paratuberculose em ovinos e caprinos no estado da Paraíba, Pesquisa Veterinária Brasileira, 32, 111–115.

- Medeiros, J.M.A., Garino Jr, F., Matos, R.A.T., Costa, V.M.M. and Riet-Correa, F. 2012b. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano, Pesquisa Veterinária Brasileira, 32, 697–700
- Mota, R.A., Pinheiro-Junior, J.W., Gomes, M.J.P., Peixoto, R.M., Maia, C.L., Brito, M.F., Chies, J.A.B., Snel, G.G.M., Bercht, S. and Juffo, G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE, Arquivos do Instituto Biológico, 74, 73–79
- Mota, P.M.P.C., Pires, P.S., Assis, R.A., Salvarani, F.M., Leite, R.M.H., Dias, L.D., Leite, R.C., Lobato, F.C.F., Guedes, R.M.C. and Lage, A.P. 2009. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a state of Paraíba, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, 29, 703–706
- Mota, R.A., Peixoto, P.V., Yamasaki, E.M., Medeiros, E.S., Costa, M.M., Peixoto, M.P., Brito, M.F. 2010. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco, Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 237–242
- Oliveira, D.M., Pimentel, L.A., Rodrigues, T.A., Dantas, A.F.M., Miranda-Neto, E.G., Simões, S.V.D. and Riet-Correa, F. 2008. Paratuberculose em bovinos no Estado da Paraíba. In: Proceedings of the 5th Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, Brasil
- Oliveira, D.M., Riet-Correa, F., Galiza, G.J.N., Assis, A.C.O., Dantas, A.F.M., Bandarra, P.M. and Garino Jr, F. 2010. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil, Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 67–72
- Schukken, I.H., Whitlock, R.H., Wolfgang, D., Grohn, Y., Beaver, A., Vankessel, J., Zurakowski, M. and Mitchell, R. 2015. Longitudinal data collection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in dairy herds: the value of precise field data, Veterinary Research, 46, 65–76
- Sivakumar, P., Tripathi, B.N., Singh, N. and Sharma, A.K. 2006. Pathology of naturally occurrence paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*), Veterinary Pathology, 43, 455–462
- Vansnick, E., Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L. and Portaels, F. 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Veterinary Microbiology, 100, 197–204
- Wolf, R., Orsel, K., De Buck, J. and Barkema, H.W. 2015. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms, Veterinary Research, 46, 71–79
- Yamasaki, E.M., Brito, M.F., McIntosh, D., Galvão, A., Peixoto, T.C. and Tokarnia C.H. 2013a. Diagnóstico imuno-histopatológico da paratuberculose subclínica em bovinos no estado do Rio de Janeiro, Pesquisa Veterinária Brasileira, 33, 1427–1432
- Yamasaki, E.M., Brito, M.F., Mota, R.A., McIntosh, D. and Tokarnia, C.H. 2013b. Paratuberculose em ruminantes no Brasil, Pesquisa Veterinária Brasileira, 33, 127–140

## Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos<sup>1</sup>

Alessandra S. Belo Reis<sup>2</sup>, Marilene F. Brito<sup>3</sup>, Pedro S. Bezerra Júnior<sup>2</sup>, Antônio A. Fonseca Júnior<sup>4</sup>, Daniel G. Ubiali<sup>3</sup>, Rinaldo A. Mota<sup>5</sup>, Rômulo C. Leite<sup>6</sup> e José D. Barbosa<sup>2\*</sup>

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

Paratuberculosis in a herd of buffaloes was studied in the municipality of São Mateus, Maranhão, Brazil. Rectal biopsies were performed in 140 male and female Murrah, Mediterranean and crossbreed buffaloes older than 3 years. Postmortem examination of 11 buffaloes was performed to compare the rectal biopsies with possible lesions in mesenteric nodes and the intestine. The history of the herd and clinical examination revealed progressive weight loss and non-responsive antimicrobial diarrhea, dehydration and submandibular edema. Rectal biopsies showed in six buffaloes microscopically suggestive lesions for paratuberculosis through hematoxylin-eosin staining (HE), characterized by moderate multifocal granulomatous enteritis with epithelioid cell infiltration. In four buffaloes Langhans giant cells were found. In 15 buffaloes lymphocytic infiltrate was observed in the lamina propria of the large intestine. Ziehl-Neelsen staining (ZN) revealed in 4.3% (6/140) acid-fast bacilli in the rectal mucosa. Real time PCR amplified to 5.71% (7/140) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) DNA. 11 buffaloes were submitted to postmortem examination, gross examination revealed augmented mesenteric nodes with whitish areas in the cut surface. The mucosa of the small intestine was irregular and thickened, with evident traverse folds and Peyer plates. The brownish intestinal content was fluid, the ileocecal valve area thickened and edematous with evident lymphatic vessels. Histological lesions in the mesenteric lymph node and small intestine four buffalo were compatible with those already described in the literature, and presented acid-fast bacilli by ZN staining and amplification of *Map* genetic material in qPCR. The concordance between the rectal biopsy and the postmortem samples was in agreement with the Kappa test (K=0.792) and was considered substantial or high. The rectal biopsy showed to be promising and can be used by practitioners, together with other techniques, for antemortem diagnosis in buffalo herds suspected to be affected by paratuberculosis. Samples obtained by rectal biopsy were suitable for ZN staining and real time PCR. Rectal biopsy can be used as a tool for diagnosis and control of Johne's disease in buffaloes to select and eliminate positive animals within the herd and decrease gradually the spread of *Map*.

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

<sup>1</sup> Recebido em 28 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 26 de outubro de 2015.

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

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

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

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

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

**RESUMO.**- Foram realizadas biópsias retais de 140 búfalos, machos e fêmeas, das raças Murrah e mestiços de Murrah com Mediterrâneo, com idade acima de três anos, em uma propriedade no município de São Mateus, Maranhão, Brasil. Adicionalmente foram realizadas necropsias de 11 búfalos, para realizar um estudo comparativo entre os achados das biópsias retais e de tecidos de íleo e linfonodo mesentérico. A propriedade apresentava histórico de animais com emagrecimento progressivo e diarreia não responsiva a antimicrobianos. Os búfalos apresentavam sinais clínicos caracterizados por diarreia, estado nutricional regular a ruim, desidratação e edema submandibular. Nas biópsias retais seis búfalos apresentaram lesões sugestivas da paratuberculose na Hematoxilina-Eosina (HE), sendo estas caracterizadas por inflamação granulomatosa multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides. Em quatro animais foram observadas adicionalmente células gigantes do tipo Langhans. Em 15 búfalos foi observado infiltrado linfocitário multifocal leve na lâmina própria. Pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), 4,3% (6/140) apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e na PCR em tempo real (qPCR), 5,71% (7/140) tiveram amplificação do material genético. Foram necropsiados 11 búfalos, à necropsia foram observados aumento de linfonodos mesentéricos com áreas esbranquiçadas na superfície de corte; intestino delgado e grosso com dobras transversais evidentes, mucosa espessada e irregular, de aspecto reticulado, placas de Peyer evidentes e conteúdo líquido e marrom. Ainda se viam áreas espessadas em torno da válvula ileocecal e vasos linfáticos evidentes. As lesões histológicas localizadas no intestino delgado e linfonodos mesentéricos de quatro búfalos foram compatíveis com lesões já descritas na literatura, e apresentaram BAAR e amplificação de material genético na qPCR. A concordância entre a biópsia retal e a análise dos tecidos de íleo e linfonodo mesentérico, segundo o teste Kappa ( $K=0,792$ ), foi alta. A biópsia retal realizada demonstrou ser promissora e pode ser empregada, juntamente com outras técnicas, para auxiliar no diagnóstico *ante mortem* em búfalos de rebanhos com suspeita de paratuberculose; pela mesma foi possível detectar animais positivos através da coloração de ZN e qPCR. Os resultados obtidos podem ser utilizados no controle da enfermidade para selecionar e eliminar animais positivos do rebanho, diminuindo gradualmente, a disseminação do agente no ambiente, e a consequente contaminação de outros animais.

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

## INTRODUÇÃO

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

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

As perdas econômicas verificadas em função da infecção subclínica se devem à redução da conversão alimentar, diminuição da produtividade, redução dos níveis de proteína e gordura no leite, perda de peso ao abate, alta incidência de mastite e diminuição da fertilidade (Clarke 1997, Yamasaki et al. 2010).

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

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

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram coletados dois fragmentos envolvendo a mucosa e submucosa do reto de cada animal, de aproximadamente 0,6cm, cranial ao orifício anal, com auxílio de uma pinça Mathieu de 45cm utilizada para biópsia. A coleta foi realizada com uso de luvas de palpação e luvas descartáveis para procedimentos, e a cada coleta, a pinça era higienizada e esterilizada. O primeiro fragmento foi coletado para Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR) e o segundo para a histopatologia (Fig.1A-C). Os fragmentos para histopatologia foram fixados em formol a 10% tamponado e processados pelos métodos usuais para exame histológico, embebidas e incluídas em parafina, cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina e eosina (HE), e em animais com lesões sugestivas de PTB, cortes adicionais foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN). As amostras foram processadas no laboratório de patologia da Universidade Federal do Pará.

O fragmento destinado para qPCR foi armazenado em tubos de polietileno tipo *ependorf* e mantidos a -20°C para posterior processamento. A extração de DNA do fragmento foi realizada por





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

Kit comercial da Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit para tecidos). A reação de qPCR foi realizada usando os *Primers* e sondas para o gene *is900* (F-5'-TGCTGATCGCCTTGCTCA-3' e R-5'-GGGCTGATCGCGATGAT-3'; S-5'-FAM-CCG GGC AGC GGC TGC TTT ATA TTC-3'-BHQ1) (Sigma®); e os *Primers* e sondas para *f57* (F-5'-TTCATC-GATACCCAACTCAGAGA-30 e R-5'-GTTCGCCGCTTGAATGGT-3'; S-5'-Cy5-5'-TGCCAGCCGCCACTCGTG-3'-BHQ2) (Sigma®) (Ireng et al. 2009). Na reação foram utilizados 2µl de solução de DNA, 12,5µl do Mix (RealQ-PCR-RT dUTP-UNG Master Mix kit) (Ampliqon, Dinamarca), *Primers* na concentração de 0,6 pmol/µl e sondas na concentração de 0,4 pmol/µl, 0,5µl de H<sub>2</sub>O e 2µl de MgCl<sub>2</sub> (50nM) (Invitrogen®), num volume total de reação de 25µl. A reação foi iniciada a 50°C durante 2 minutos, e 95°C, durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C, durante 15 segundos, anelamento/extensão a 60°C durante 1 minuto. Cada amostra foi testada em triplicata no termociclador LightCycler 480 (Roche, Alemanha) de análise de dados.

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

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

## RESULTADOS

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

### Sinais clínicos

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

### Biópsia retal

Em seis búfalos (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141 e 188) foram observadas lesões sugestivas da paratuberculose na HE, sendo estas caracterizadas por inflamação granulomatosa multifocal moderada na lâmina própria com macrófagos epitelioides. Em quatro animais foram observadas adicionalmente células gigantes do tipo Langhans (Búfalos 2, 139, 141 e 188) (Fig.2) (Quadro 1). Em 15 búfalos foi observado infiltrado linfocitário multifocal leve na lâmina própria. No Ziehl-Neelsen, 4,3% (6/140) dos búfalos apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141 e 188) e na qPCR, 5,71% (7/140) tiveram amplificação do material genético (Búfalos 2, 3, 18, 139, 141, 188 e 189) (Quadro 1).

### Achados anatomopatológicos

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

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

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

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

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

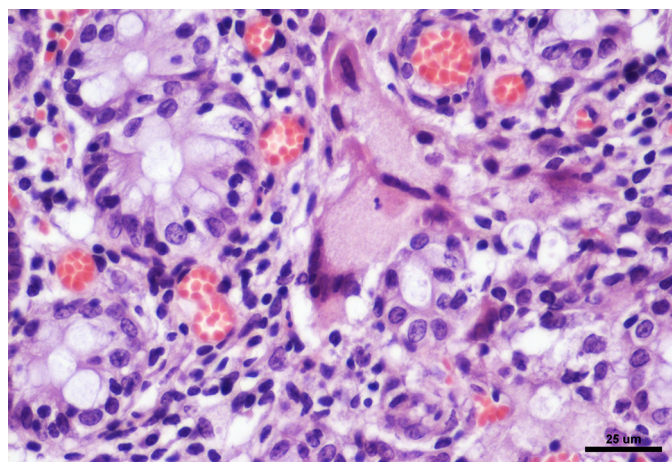


Fig.2. Células gigantes de Langhans na lâmina própria entre as criptas intestinais, na biópsia retal do Búfalo 2 com paratuberculose. HE, obj.40x.

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

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

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

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

\*Baseado no teste de ZN e de qPCR.

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

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

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



## Estatística

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

## DISCUSSÃO

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

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

Na biópsia retal apenas um búfalo apresentou qPCR positivo (189) e ausência da bactéria no teste de ZN. Quando a carga bacteriana é baixa, os bacilos podem não ser detectados ao exame histológico, o que poderia explicar o resultado negativo à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e positivo na qPCR (Zimmer et al. 1999). Isso também pode ser justificado pelo segmento analisado, que segundo Mota et al. (2010) e Dalto et al. (2012), nesta região, podem ser visualizadas lesões leves, e que geralmente a carga bacteriana é mais baixa. Apenas um búfalo não apresentava sinais clínicos, mas foi positivo em ambos os testes (Búfalo 2). Os animais subclínicos, portadores e prováveis eliminadores da bactéria são fontes de infecção para outros animais, e representam um desafio para o diagnóstico, o que dificulta o controle da enfermidade; estima-se que para cada animal infectado, há de 15 a 25 ruminantes subclínicos no rebanho

(Radostits et al. 2007). Através da biópsia retal, foi possível detectar um animal subclínico no rebanho.

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

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

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

## CONCLUSÕES

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Silveira J.A.S., Albernaz T.T., Silva N.S., Reis A.S.B., Oliveira C.H.S. & Yamasaki E.M. 2010. Paratuberculosis in water buffaloes (*Buballus bubalis*) in Maranhão State, Brazil. Anais XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile.

- Brito M.F. 2015. Comunicação pessoal (Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ).
- Chiodini R.J. & Van Kruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218-262.
- Clarke C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116:217-261.
- Clark Jr D.L., Koziczkowski J.J., Radcliff R.P., Carlson R.A. & Ellingson J.L.E. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 91:2620-2627.
- Dalto A.G.C. 2011. Achados clínicos e patológicos de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 62p.
- Dalto A.C., Bandarra P.M., Pavarini S.P., Boabaid F.M., Bitencourt A.P.G., Gomes M.P., Chies J., Driemeier D. & Cruz C.E.F. 2012. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1-5.
- Driemeier D., Cruz C.E.F., Gomes M.J.P., Corbellini L.G., Loretti A.P. & Colodel E.M. 1999. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(3/4):109-115.
- Ireng L.M., Walravens K., Govaerts M., Godfroid J., Rosseels V., Huygen K. & Gala J.L. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR-RT for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol.* 136:166-172.
- Juste R.A. & Aduriz J.J. 1990. *Diagnostico. Ovis* 7:49-62.
- Manning E.J.B. & Collins M.T. 2010. History of paratuberculosis, p.2-9. In: Berhs M.A. & Collins D.M. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control.* CAB International, Cambridge. 375p.
- Mota R.A., Peixoto P.V., Yamasaki E.M., Medeiros E.S., Costa M.M., Peixoto R.M. & Brito M.F. 2010. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):237-242.
- OIE 2014. World Organization for Animal Health. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf)> Acessado em 23 out. 2015.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with bacteria. IV, p.1014-1044. In: *Ibid.* (Eds), *A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats: veterinary medicine.* 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. Paratuberculose, p.329-334. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos.* Vol.2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Siegel S. & Castellan N. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences.* 2nd ed. McGraw-Hill, New York, p.284-285.
- Sivakumar P., Tripathi B.N. & Singh N. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymphnode tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.* 108:263-270.
- Zimmer K., Dräger K.G. & Klawonn W. & Hess R.G. 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. B.* 46:137-140.
- Yamasaki E.M., Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):127-140.
- Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-932.



## Teores de cobre, zinco e ferro no fígado de búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose<sup>1</sup>

Alessandra S. Belo Reis<sup>2</sup>, Marilene F. Brito<sup>3</sup>, Henrique A. Bomjardim<sup>2</sup>, Kelson C.F. Faial<sup>4</sup>, Felipe M. Salvarani<sup>2</sup>, Daniel G. Ubiali<sup>3</sup>, Carlos Magno C. Oliveira<sup>2</sup> e José D. Barbosa<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- Belo Reis A.S., Brito M.F., Bomjardim H.A., Faial K.C.F., Salvarani F.M., Ubiali D.G., Oliveira C.M.C. & Barbosa J.D. 2016. [**Copper, zinc and iron content in the liver of buffaloes (*Bubalus bubalis*) with paratuberculosis.**] Teores de cobre, zinco e ferro no fígado de búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(1):24-28. Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brazil. E-mail: [diomedes@ufpa.com](mailto:diomedes@ufpa.com)

In order to study copper, zinc and iron concentration in the liver of buffaloes with paratuberculosis (PTB), 13 buffalo cows above three years of age of the Murrah and Mediterranean races or their crosses were used. They originated from two farms in the municipalities of São Luís and São Mateus, state of Maranhão, Brazil. The animals were selected according to clinical signs of paratuberculosis, as diarrhea, dehydration and submandibular edema. Rectal biopsies for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) through PCR in real time (qPCR) and Ziehl-Neelsen (ZN) stain were performed on all animals. Seven buffaloes revealed positive and six were negative for PTB. They were separated into two groups: Group 1 contained seven buffaloes positive for paratuberculosis, and Group 2 contained six animals negative for paratuberculosis. They were euthanized and postmortem examination was performed for the collection of various tissue samples to be fixed in 10% formalin for histopathology; also liver tissue samples were collected to be frozen for chemical analysis of trace minerals (Cu, Zn and Fe). Postmortem showed that all buffaloes with PTB had brown colored mesenteric lymphnodes, indicating hemosiderosis. One buffalo had brown spots on the mucosa of the small intestine. Histopathology revealed moderate to severe hemosiderosis of the spleen in buffaloes of Group 1. All animals positive for PTB showed micromineral levels below the reference values. The average Cu concentration in buffaloes with PTB was only 18.0ppm and the one of Zn only 68.6ppm. In Group 2, negative for PTB, the average Cu concentration was 113.7ppm and the one of Zn 110.0ppm. Fe concentrations in buffaloes of both groups were high (>669ppm). The analysis of trace elements in the liver confirmed copper deficiency, but also showed low levels of zinc and high levels of iron. Based on clinical and pathological findings, and the micromineral concentrations found in the liver, it is concluded that paratuberculosis could lead to mineral deficiency and worsen the clinical condition of the buffaloes.

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

<sup>1</sup> Recebido em 26 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 25 de janeiro de 2016.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Bairro Saudade, Castanhal, PA 68740-970, Brasil. \*Autor para correspondência: [diomedes@ufpa.com](mailto:diomedes@ufpa.com)

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

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

**RESUMO.**- Com o objetivo de realizar um estudo dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) em búfalos com paratuberculose (PTB) foram utilizadas 13 búfalas, das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços acima de três anos de idade, pertencentes a duas propriedades localizadas nos municípios de São Luiz e São Mateus, no Estado do Maranhão. Os animais foram selecionados de acordo com a presença de sinais clínicos sugestivos de paratuberculose, caracterizados por estado nutricional regular a ruim, diarreia crônica líquida a semi-líquida, desidratação, edema submandibular, anestro

prolongado, mastites e verminose gastrintestinal. Foi realizada biópsia retal em todos os animais, para detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) por meio da qPCR, e exames histopatológicos (HE e Ziehl-Neelsen). No Grupo 1 sete animais foram positivos para presença de *Map*, e no Grupo 2 seis foram negativos. Todos os búfalos foram eutanasiados e necropsiados para coleta de diversos tecidos. Parte dos fragmentos foram fixados em formol a 10% para histopatologia e fragmentos de tecido hepático foram congelados para as dosagens dos microminerais (Cu, Zn e Fe). À necropsia todos os animais positivos para PTB apresentavam linfonodos mesentéricos de coloração castanha sugestiva de hemossiderose. Adicionalmente, em um animal foram observados pequenos pontos de cor marrom distribuídos difusamente na mucosa do intestino delgado. Na histopatologia foi observada hemossiderose moderada a acentuada no baço dos animais do Grupo 1. Na dosagem dos microminerais todos os animais com PTB apresentaram níveis abaixo dos valores de referência para Cu e Zn. Observou-se que a média dos teores de Cu dos búfalos com PTB foi 18,0ppm e de Zn 68,6ppm. No Grupo 2 a média dos teores de Cu foi 113,7ppm e de Zn 110,0ppm. Os teores de Fe em ambos os grupos foram elevados (>670ppm). Baseado nos achados clínico-patológicos e nas dosagens de minerais realizadas neste estudo, conclui-se que na região estudada, a PTB agravou o quadro clínico de animais com deficiência de Cu e Zn. Em áreas menos deficientes desses minerais sugere-se que a doença seja capaz de induzir quadros de deficiência mineral secundária.

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

## INTRODUÇÃO

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

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

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

Paolicchi et al. (2013) realizaram estudo com amostras de soro bovino e observaram relação entre a deficiência de selênio com a infecção por *Map*. Os autores também cons-

tatarem que um aumento de 10ppm de ferro no solo pode estar associado com o aumento no número de animais soropositivos para PTB. Lungton (2004) fez um paralelo entre a PTB e as deficiências de macro e microminerais, e inferiram que quadros graves da doença estão relacionados com as deficiências minerais, atentando para a necessidade de mais estudos dentro dessa linha de pesquisa. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo dos teores de cobre, zinco e ferro em búfalos positivos para PTB no estado do Maranhão.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

**Dosagem de minerais.** As amostras de fígado foram seccionadas em fatias finas utilizando-se navalhas limpas e de aço inoxidável, armazenadas em tubos de polipropileno de 50mL e submetidas ao processo de liofilização. Para esse processo, as amostras foram congeladas a -20°C acondicionadas em bandejas e colocadas em aparelho automatizado LIOTOP® (modelo L101), previamente ligado por um período de 10 minutos a uma temperatura de -55°C, as quais permaneceram por um período de 24h para a secagem completa. Posteriormente, as amostras foram trituradas em grau e pistilo (Pinheiro et al. 2011).

Para a determinação dos minerais Cu, Zn e Fe, as amostras trituradas foram pesadas entre 0,250 a 0,260g e colocadas em tubo de digestão de Teflon (modelo Xpress). Em seguida foram adicionados 3mL de ácido nítrico PA 65% (QUIMEX), 1mL de ácido clorídrico a 30% (MERCK) e 1mL de peróxido de hidrogênio PA 30% (BIOTEC); ficaram em repouso durante 2h para uma pré-digestão e digeridas por 50 minutos em sistema fechado por radiação de



micro-ondas (MARSXpress, CEM Corp. Matthews, NC, USA). Após a digestão, os minerais Cu, Zn e Fe foram analisados pela técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP-OES) no equipamento ICP-OES (Vista-MPX CCD simultâneo, axial da VARIAN) em sistema de amostragem automático (SPS-5). O controle das condições operacionais do ICP-OES foi realizado com o software iTEVA. Os brancos analíticos foram preparados pelos mesmos procedimentos sem a adição das amostras de fígado (Nomura et al. 2005). As análises foram realizadas no Instituto Evandro Chagas (ICE).

**Estatística.** Os resultados foram submetidos à análise de variância em delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey (SAS 2003).

## RESULTADOS

Na fazenda localizada no município de São Mateus, MA, verificou-se que aproximadamente 70% das pastagens eram em terra firme composta por *Brachiaria* spp. (sinonímia *Urochloa*) e 30% em região de várzea composta por pastagens nativas. No ambiente de terra firme as fontes de água eram bebedouros, e na região de várzea os animais bebiam nos lagos formados durante o período de chuva. Na fazenda no município de São Luís as pastagens eram em terra firme

compostas por *Brachiaria* spp. (Sinonímia *Urochloa*). Em ambas as fazendas a suplementação protéico-energética era ofertada em cochos descobertos e a oferta não era contínua ao longo do ano; no período de maior estiagem era ofertado somente sal proteinado.

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

Os sete búfalos positivos para detecção de *Map* (Grupo 1) apresentaram achados macroscópicos compatíveis com PTB, tais como aumento de linfonodos mesentéricos, mucosa do intestino delgado e grosso espessada, irregular, de aspecto reticulado e com dobras transversais evidentes. Observaram-se ainda áreas espessadas em torno da válvula íleocecal, vasos linfáticos evidentes e áreas esbranquiçadas na superfície de corte dos linfonodos mesentéricos (Fig.2). Foi evidenciado também que esses animais tinham linfonodos mesentéricos com áreas de coloração acastanhada



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

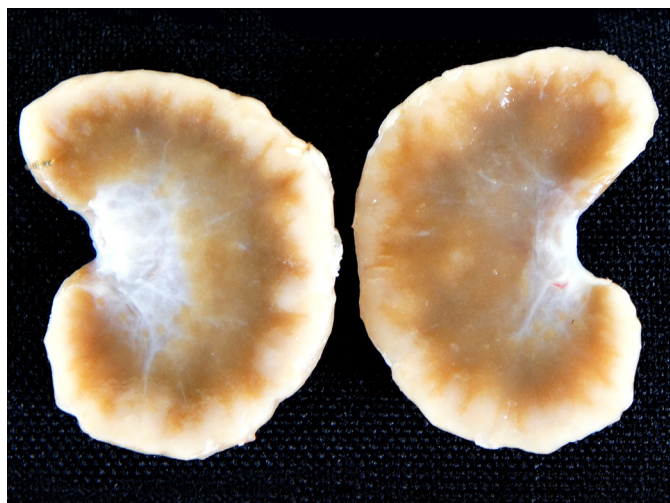


Fig.2. Linfonodos mesentéricos do Búfalo 3 de cor marrom com áreas esbranquiçadas na superfície de corte.



Fig.3. Pequenos pontos marrons distribuídos difusamente na mucosa intestinal do Búfalo 3, compatível de hemosiderose.

sugestiva de hemossiderose (Fig.2). Adicionalmente, no Búfalo 3 foram observados pequenos pontos difusos de cor marrom na mucosa do intestino delgado (Fig.3), também sugestivos de hemossiderose. No Grupo 2 apenas três animais (Búfalos 8, 9 e 10) apresentaram linfonodos mesentéricos de coloração castanha escura.

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

Na qPCR foram positivos para *Map* os Búfalos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 em fragmentos do íleo e linfonodos mesentéricos, e o Búfalo 4 foi positivo em fragmento do íleo e negativo em fragmento do linfonodo mesentérico. Os valores individuais, médias e desvio padrão dos teores de Cu e Zn no fígado dos búfalos avaliados com e sem paratuberculose estão apresentados no Quadro 1. Houve diferença estatística nos teores hepáticos de cobre, entre os grupos avaliados.

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

Identificação	Cobre (ppm)	Zinco (ppm)	Ferro (ppm)
<b>Búfalos com paratuberculose</b>			
Búfalo 1	69,1	69,3	593,1
Búfalo 2	17,6	64,4	803,5
Búfalo 3	11,7	74,1	1285,4
Búfalo 4	11,6	43,4	689,6
Búfalo 5	8,0	54,7	686,8
Búfalo 6	5,5	80,6	800,6
Búfalo 7	3,0	93,9	1043,3
Média <sup>1</sup>	18,1b	68,6	843,2
Desvio padrão	±23	±16,7	±241,4
Valores de referência <sup>2</sup>	<100	<100	181-380
<b>Búfalos negativos</b>			
Búfalo 8	88,7	197,3	795,5
Búfalo 9	136,6	113,0	1162,9
Búfalo 10	125,4	68,1	478,6
Búfalo 11	56,4	65,8	316,2
Búfalo 12	95,1	140,8	484,3
Búfalo 13	179,9	75,0	781,8
Média <sup>1</sup>	113,7a	110,0	669,9
Desvio padrão	±43,1	±52,0	±305,8
Valores de referência <sup>2</sup>	<100	<100	181-380
Coefficiente de variação	19	21	152
Valor de P	0,003	0,071	0,277

<sup>1</sup> Médias com letras diferentes na vertical diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Underwood (1977).

Os teores dos microminerais Cu e Zn no fígado dos búfalos com paratuberculose (Grupo 1) apresentaram-se abaixo do normal; os teores de Fe em todos os búfalos foram superiores aos valores de referência. Quando se analisa as médias verifica-se que os teores de cobre estão extremamente baixos e os teores de zinco moderadamente baixos. Já a média dos teores de Fe foi mais de duas vezes superior aos teores normais (Quadro 1).

Nos búfalos sem paratuberculose (Grupo 2), 50% (3/6) apresentam teores de Cu considerados como subdeficientes e quando se analisa a média obtida pelos seis búfalos verifica-se que os teores encontram-se acima de 100ppm, considerados no limite de normalidade. Achado semelhante foi obtido com o Zn onde também 50% (3/6) apresentaram teores abaixo de 100ppm, considerados também como subdeficientes. Quando se considera a média dos teores de Zn dos seis animais, esta ficou acima de 100ppm, também considerada no limite de normalidade (Quadro 1).

## DISCUSSÃO

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

Neste estudo, os búfalos com PTB, além das lesões típicas da enfermidade apresentaram, concomitantemente, lesões compatíveis com a deficiência de Cu, que posteriormente foi confirmada por meio da histopatologia e da dosagem do elemento no fígado. Nos animais negativos os achados de necropsia foram compatíveis apenas com deficiência de energia e proteína.

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

A média dos teores de Zn nos animais do Grupo 1 foi 68,6ppm e no Grupo 2 de 110,0ppm. Segundo Underwood (1977), valores de Zn no fígado menores que 100ppm indicam deficiência e valores acima de 101ppm são considerados normais. Neste estudo ficou demonstrado que os animais com PTB apresentaram níveis de Zn abaixo dos considerados normais. Nos búfalos com PTB não foram observadas manifestações clínicas da deficiência de Zn, pos-



sivelmente por se tratar de uma deficiência de zinco marginal. Tokarnia et al. (2010) estudaram a deficiência de Zn e concluíram que provavelmente em algumas regiões, as quantidades de Zn, mesmo baixas, ainda seriam suficientes para satisfazer as exigências dos animais.

Conforme Underwood & Suttle (1999) as deficiências de Cu e Zn têm influência direta na resposta imune. Como a concentração de Cu e Zn nos búfalos do Grupo 1 foram baixas, possivelmente a resposta imunológica já estava comprometida e consequentemente, esse pode ser mais um fator que levou ao agravamento do quadro clínico da PTB e predispôs à maior susceptibilidade a outras infecções.

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

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

Com relação ao quadro de emagrecimento observado nos animais sem paratuberculose (Grupo 2), pode ser justificado pela baixa oferta de alimentos no período de estiagem, quando foram realizadas as visitas técnicas às propriedades. Outro fator que poderia contribuir seria os baixos teores de alguns minerais, causando uma deficiência subclínica, como foi observado em alguns búfalos sem paratuberculose (Búfalos 8, 11 e 12). De acordo com Tokarnia et al. (2010) as deficiências de energia e proteína são as que causam os maiores prejuízos.

## CONCLUSÃO

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

**Agradecimentos.**- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, ao Instituto Evandro Chagas pelo apoio à realização das dosagens dos minerais e à Dra Simone Frotas dos Reis pelo apoio com as análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS

- Belo Reis A.S., Brito M.F., Bezerra Jr P.S., Fonseca Jr A.A., Ubiali D.G., Mota R.A., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. Diagnóstico de paratuberculose por biópsia retal em búfalos. *Pesq. Vet. Bras.* 35(10):823-828.
- Carvalho F.A.N., Barbosa F.A. & McDowel L.R. 2003. Nutrição de Bovinos a Pasto. *Papelform*, Belo Horizonte. 438p.
- Chiodini R.J. & Van Kruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218-262.
- Clarke C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116:217-261.
- CONCEA 2008. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, V do Art. 5º da Lei no.11.794, de 8 de outubro de 2008.
- Lamb G.C., Brown D.R., Larson J.E., Dahlen C.R., Dilorenzo N., Arthington J.D. & Dicostanzo A. 2008. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated Angus heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 106(3/4):221-231.
- Lounis N., Truffot-Pernot C., Grosset J., Gordeuk V.R. & Boelaert J.R. 2001. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Clin. Virol.* 20:123-126.
- Lungton I.W. 2004. Review of possible links between the clinical expression of paratuberculosis and deficiency of macro and micronutrients. *Aust. Vet. J.* 82(8):490-496.
- Mota R.A., Peixoto P.V., Yamasaki E.M., Medeiros E.S., Costa M.M., Peixoto R.M. & Brito M.F. 2010. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):237-242.
- Nomura C.S., Silva C.S., Nogueira A.R.A. & Oliveira P.V. 2005. Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta B.* 60:673-680.
- Pinheiro C.P., Bomjardim H.A., Andrade S.J.T., Faial K.C.F., Oliveira C.M.C. & Barbosa J.D. 2011. Níveis de fósforo, cobre, cobalto e zinco em bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):193-198.
- Paolicchi F., Perea J., Cseh S. & Morsella C. 2013. Relationship between paratuberculosis and the microelements copper, zinc, iron, selenium and molybdenum in beef cattle. *Braz. J. Microbiol.* 44(1):153-160.
- SAS Institute Inc. 2003. Statistical analysis system. Release 9.1. (Software). Cary. USA.
- Sweeney R.W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 12(12):305-312.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Barbosa J.D., Brito M.F. & Döbereiner J. 2010. Deficiências Minerais em Animais de Produção. *Helianthus*, Rio de Janeiro, 191p.
- Underwood E.J. 1977. Trace Elements in Human and Animals Nutrition. 4th ed. Academic Press, New York. 545p.
- Underwood E.J. & Suttle N.F. 1999. The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd ed. CABI Publishing, Wallingford. 614p.
- Wilde D. 2006. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96:240-249.
- Yamasaki E.M., Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):127-140.
- Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. Aspectos clínicos patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):921-932.