

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO,
IMUNO-HISTOQUÍMICO E MOLECULAR DA
PARATUBERCULOSE SUBCLÍNICA EM BOVINOS
NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ELISE MIYUKI YAMASAKI

2013



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

TESE

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E
MOLECULAR DA PARATUBERCULOSE SUBCLÍNICA
NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ELISE MIYUKI YAMASAKI

Sob a orientação do Professor
Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia

e co-orientação da Professora
Marilene de Farias Brito

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau **Doutor em Ciências
Veterinárias**, do Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Sanidade Animal

Seropédica, RJ
2013

636.208963

4

Y19d

T

Yamasaki, Elise Miyuki, 1978-
Diagnóstico histopatológico,
imuno-histoquímico e molecular da
paratuberculose subclínica na Região
Sul do Estado do Rio de Janeiro /
Elise Miyuki Yamasaki - 2013.
xv, 100 f.: il.

Orientador: Carlos Maria Antonio
Hubinger Tokarnia.

Tese (Doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2013.

Bibliografia: f. 76-97.

1. Bovino - Doenças - Diagnóstico
- Teses. 2. Paratuberculose -
Diagnóstico - Teses. 3.
Paratuberculose - Tratamento -
Teses. 4. Diagnóstico de laboratório
- Teses. 5. Patologia veterinária -
Teses. I. Tokarnia, Carlos Hubinger,
1929-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

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

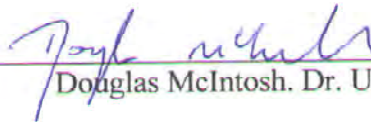
ELISE MIYUKI YAMASAKI

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Ciências Veterinárias** no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

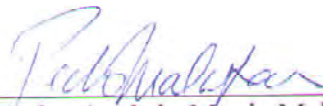
TESE APROVADA EM 18/02/2013



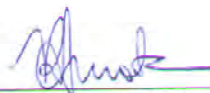
Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Douglas McIntosh. Dr. UFRRJ



Pedro Antônio Muniz Malafaia. Dr. UFRRJ



Rinaldo Aparecida Mota. Dr. UFRPE



Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho. Dr. UENF

Seropédica, 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo;

Ao Professor Tokarnia e à Professora Marilene pelas oportunidades e pelo extraordinário exemplo de simplicidade, trabalho e dedicação nos afazeres do dia a dia;

Ao Professor Douglas McIntosh, pela disponibilidade e dedicação no delineamento e desenvolvimento das atividades laboratoriais da tese e na discussão dos resultados obtidos;

Aos amigos, cujo companheirismo e confiança foram essenciais para a elaboração e conclusão desta etapa;

E por fim, mas não menos importante, à UFRRJ, pelas oportunidades na graduação em Medicina Veterinária e Pós-Graduação em Patologia Animal.

RESUMO

A dificuldade no diagnóstico da paratuberculose na fase assintomática está relacionada principalmente à resposta imune do hospedeiro frente aos diversos estágios da enfermidade; a maioria dos animais infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) não apresenta e não apresentará sinais clínicos característicos da enfermidade ao longo de sua vida e pode eliminar, intermitentemente, o agente infeccioso no ambiente, através das fezes, mantendo a infecção no rebanho. Atualmente, os testes laboratoriais disponíveis para diagnóstico subclínico da paratuberculose apresentam baixa eficiência, o que limita o diagnóstico precoce da enfermidade e contribui para a ineficiência das medidas de controle da infecção no rebanho. O desenvolvimento de técnicas confiáveis e específicas para a detecção “post-mortem” da paratuberculose possibilita o diagnóstico antes do aparecimento dos sinais clínicos, e pode auxiliar na elaboração de novos testes para detecção “in vivo” da infecção. No Brasil, a paratuberculose já foi descrita em diversas espécies de ruminantes e em vários estados, no entanto, não há programas sanitários oficiais para o controle da enfermidade. Um dos objetivos deste trabalho foi detectar a infecção pré-clínica da paratuberculose em bovinos oriundos de rebanho positivo para paratuberculose por metodologias de diagnóstico anátomo-patológico. Foram realizados estudos histopatológico, histoquímico e imuno-histoquímico de intestino delgado e linfonodos mesentéricos coletados no frigorífico local. À histopatologia, observaram-se lesões compatíveis com paratuberculose em animais assintomáticos; bacilos álcool-ácido resistentes não foram visualizados e a imuno-histoquímica mostrou marcação positiva em alguns fragmentos analisados. A partir dos resultados, podemos afirmar que o teste de imuno-histoquímica pode ser uma importante ferramenta para detecção de Map, especialmente em tecidos com lesões tuberculoide ou “paucibacillary”, enriquecendo os métodos convencionais de diagnóstico histopatológico para confirmação da infecção. Além disso, em situações onde não há disponibilidade de material para cultivo bacteriano pode-se utilizar desta metodologia para conclusão do diagnóstico. Na segunda parte do trabalho, foi realizado um estudo comparativo de duas soluções fixadoras de tecido, uma contendo formol, substância tradicionalmente utilizada em laboratórios de patologia e a outra composta por sais de zinco. O intuito do estudo foi avaliar a manutenção da histomorfologia, a capacidade de detecção de bacilos álcool-ácido resistentes e antígenos de *Mycobacterium* spp. por imuno-histoquímica e amplificação dos fragmentos de DNA bovino e de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* por PCR GAPDH, IS900 e F57, em fragmentos de íleo e linfonodo mesentérico fixados, de bovino com paratuberculose clínica. Avaliaram-se, também, possíveis alterações causadas em diferentes períodos de tempo em que os fragmentos foram mantidos na solução fixadora. Verificou-se notável manutenção da arquitetura do tecido em fragmentos fixados em solução de zinco, com qualidade da imagem histológica similar aos tecidos fixados em formol; os resultados obtidos pela coloração de Ziehl-Neelsen e imuno-histoquímica foram semelhantes nos dois fixadores. Já a PCR mostrou amplificação apenas nas amostras fixadas em zinco, o que demonstra que este fixador pode ser uma ferramenta importante para manutenção de ácidos nucleicos e macromoléculas para estudos genéticos e proteômicos.

Palavras-chave: Paratuberculose subclínica. Diagnóstico laboratorial. Patologia.

ABSTRACT

The difficulty of diagnosis of subclinical paratuberculosis (Johne's disease), caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), is mainly related to host immune responses to the different stages of infection; the majority of infected animals does not and will not present throughout their life clinical signs characteristic of the disease, and can intermittently eliminate the infectious agent through feces into the environment, keeping the infection in the herd. Currently, the laboratory tests available for the diagnosis of subclinical paratuberculosis are unsatisfactory, limiting the early diagnostic of the disease and contribute to the inefficiency of control measures for infection in the herd. The development of reliable and specific techniques for detecting paratuberculosis at "post-mortem" examination could allow preclinical diagnosis contribute to development of a new test for "in vivo" diagnosis of the infection. In Brazil, paratuberculosis has been reported from different ruminant species and has a broad geographic distribution; however, there exists no official program for control of the disease. An objective of this study was to detect preclinical infection of paratuberculosis in cattle through pathological methodologies for the diagnosis in paratuberculosis positive herds. Histopathological, histochemical and immunohistochemical studies of the small intestine and mesenteric lymph nodes collected in the slaughter house were performed. Histopathology revealed lesions compatible with paratuberculosis in asymptomatic cattle, without visualization of acid-fast bacilli, and immunohistochemistry resulted in positive staining in some fragments analyzed. The results obtained in this study show that immunohistochemistry could be an important tool for detecting Map, especially in tissues with few mycobacteria, and enrich conventional methods for histopathological confirmation of the diagnosis of Johne's disease. Additionally, in situations where there is no availability of material for culture, this methodology could be used for diagnostic conclusion. - In the second part of this study, we compared two tissue fixative solutions: one containing formaldehyde, traditionally used in pathology laboratories, and the other consisting of zinc salts. The purpose was to evaluate (1) the maintenance of histomorphology, (2) the ability to detect acid-fast bacilli and antigens of *Mycobacterium* spp. by immunohistochemistry, and (3) the amplification of DNA fragments of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR IS900 and F57 in sections of formaldehyde fixed ileum and mesenteric lymph nodes from cattle with paratuberculosis. Also were evaluated possible variations caused by different time periods during which the fragments were kept in the fixative solution. We found that (1) the zinc-based fixative showed remarkable maintenance of tissue architecture with similar histological image quality of tissues fixed in formalin, (2) the results obtained by Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry were similar with the two fixative solutions used. However, PCR amplification was observed only with samples fixed in zinc salts, what demonstrates that this latter fixative can be an important tool for maintenance of nucleic acids and macromolecules for genetic and proteomic studies.

Key words: Subclinical paratuberculosis. Laboratorial diagnostic. Pathology.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vaca 383, magra com paratuberculose clínica (Rebanho A), localizado no município de Rio Claro, RJ	24
Figura 2	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vasos linfáticos mesentéricos e subserosos do intestino delgado, proeminentes e esbranquiçados de vaca com paratuberculose clínica (Vaca 383) do Rebanho A localizado no município de Rio Claro, RJ.	24
Figura 3	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vaso linfático em serosa do intestino delgado proeminente e com aspecto varicoso em Vaca 276 com paratuberculose clínica do Rebanho A no município de Rio Claro, RJ.	25
Figura 4	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Citologia de raspado de mucosa do íleo, de vaca com paratuberculose clínica (Vaca 276) do Rebanho A no município de Rio Claro, RJ. A coloração de Ziehl-Neelsen revelou aglomerados de bacilos álcool-ácido resistentes	25
Figura 5A	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa avermelhada do íleo de vaca assintomática proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 518, SAP 31067.	26
Figura 5B	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa intestinal avermelhada de vaca assintomática proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Abate realizado em 2007.	27
Figura 6	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa de duodeno com elevações e projeções de bovino assintomático (Vaca 485) do Rebanho A, positivo para paratuberculose.	27
Figura 7	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Placa de Peyer proeminente em jejuno de bovino assintomático (Vaca 202) do Rebanho A, positivo para paratuberculose.	28
Figura 8	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vasos linfáticos intestinais mesentéricos e subserosos evidentes de bovino assintomático proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose, no município de Rio Claro, RJ. Abate realizado em 2007.	28
Figura 9	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa de jejuno com moderada	35

infiltração granulomatosa e formação de células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 562, SAP 30985, HE, obj.4x.

- Figura 10** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vilosidade de mucosa do jejuno espessada devido à moderada infiltração por macrófagos epitelioides e células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 483, SAP 31072, HE, obj.16x. 35
- Figura 11** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa do íleo com moderada infiltração mononuclear e presença de células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 518, SAP 31067, HE. Obj.10x. 36
- Figura 12** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Espessamento da lâmina própria da mucosa do íleo decorrente da infiltração mononuclear e de células gigantes de Langhans de vaca assintomática de Rebanho A positivo para paratuberculose Vaca 518, SAP 31067, HE, obj.10x. 36
- Figura 13A** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Submucosa de jejuno com inúmeras células gigantes de Langhans e macrófagos com citoplasma vacuolizado na luz de vaso linfático de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 549, SAP 30943, HE, obj.16x. 37
- Figura 13B** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Detalhe da figura anterior. Luz de vaso linfático com inúmeros macrófagos com citoplasma vacuolizado. Vaca 549, SAP 30943, HE, obj.40x. 37
- Figura 14** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Seio subcapsular de linfonodo mesentérico com inflamação granulomatosa rica em células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose Vaca 524, SAP 30965, HE, obj.16x. 38
- Figura 15** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com inúmeras células gigantes de Langhans em linfonodo mesentérico de bovino do Rebanho B, positivo para paratuberculose. SAP 31628, obj.20x. 38
- Figura 16** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A fixação por solução de zinco conferiu manutenção da estrutura histológica similar ao observado pela fixação por formol, no entanto, apresentou encolhimento das células, em graus leve a moderado. Íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixado em solução de zinco e de formol em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Hematoxilina-eosina. 40

Figura 17	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Encolhimento das células, em graus leve a moderado, foi observado em tecidos fixados pela solução de zinco. Linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Hematoxilina-eosina.	41
Figura 18.	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A evivenciação de bacilos álcool-ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen foi similar nos dois fixadores avaliados em secções de íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Obj. 20x.	43
Figura 19	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A evivenciação de bacilos álcool-ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen foi similar nos dois fixadores avaliados. Linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Vaca 383, Rebanho A. Obj. 20x.	44
Figura 20	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Controle positivo do teste de imuno-histoquímica para <i>Mycobacterium</i> spp. Íleo de vaca com paratuberculose do Rebanho A. Vaca 500, SAP 31598, obj.40. Imuno-histoquímica, LSAB peroxidase, cromógeno AEC.	45
Figura 21A	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com células gigantes no linfonodo mesentérico demonstrando leve marcação positiva para <i>Mycobacterium</i> spp de bovino assintomático oriundo do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40. Imuno-histoquímica, LSAB, cromógeno AEC.	46
Figura 21B	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com células gigantes em linfonodo mesentérico, demonstrando marcação positiva para <i>Mycobacterium</i> spp de bovino assintomático oriundo do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40, imuno-histoquímica, LSAB, cromógeno AEC.	47
Figura 21C	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Maior aumento da infiltração granulomatosa em linfonodo mesentérico demonstrando marcação positiva para <i>Mycobacterium</i> spp de bovino assintomático do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40, imuno-histoquímica, LSAB, cromógeno AEC.	47
Figura 22	Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. O teste de imuno-histoquímica para <i>Mycobacterium</i> spp. foi positivo para os dois fixadores avaliados, no	50

entanto, fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco não revelou marcação. Íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo, A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. LSAB peroxidase, AEC.

- Figura 23** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco apresentaram diminuição da intensidade de marcação para *Mycobacterium* spp. no teste de imuno-histoquímica. Linfonodos mesentéricos de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados na solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo, A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. LSAB peroxidase, AEC. 51
- Figura 24** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Eletroforese em gel de Ágar de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol, extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio. 53
- Figura 25** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Resultado da PCR GAPDH de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio. 57
- Figura 26** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Resultado da PCR IS900 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio. 61
- Figura 27** Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Resultado da PCR F57 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio. 62

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Histórico da paratuberculose no Brasil 4
Tabela 2	Sequência do “primer” GAPDH para amplificação de DNA de bovino e tamanho do “amplicon” da PCR utilizado neste estudo (CANNON; DAVIS; PATE, 2007) 21
Tabela 3	Sequência, posição e tamanho do “amplicon” dos primers de Map utilizados neste estudo (VANSNICK et al., 2004) 22
Tabela 4	Macroscopia do intestino delgado e linfonodos mesentéricos de vacas assintomáticas abatidas do Rebanho A, positivo para paratuberculose, localizado no município de Rio Claro, RJ. 29
Tabela 5	Histopatologia do intestino delgado e linfonodos mesentéricos das vacas assintomáticas abatidas do rebanho A, positivo para paratuberculose, localizada no município de Rio Claro, RJ. 33
Tabela 6	Quantidade de bovinos que apresentaram alterações compatíveis com paratuberculose em diferentes testes laboratoriais 48
Tabela 7	Quadro geral com os resultados da análise histomorfológica (hematoxilina-eosina e coloração de Ziehl-Neelsen), imuno-histoquímica, PCR GAPDH, IS900 e f57, de tecidos fixados em solução de zinco e em formol e, incluídos em parafina 49
Tabela 8	Dados obtidos em espectrofotômetro, de amostras de DNA extraído pela metodologia do fenol-clorofórmio e por kit comercial de tecidos fixados em solução de formol e em zinco 54
Tabela 9	Resultado da espectrofotometria de DNA extraído de amostras de sangue bovino, utilizado para controle positivo da PCR GAPDH 55
Tabela 10	Resultados da PCR GAPDH de fragmentos de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco e de formol, e incluídos em parafina 56
Tabela 11	Dados obtidos na PCR IS900, de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose fixados em solução de zinco e de formol e incluídos em parafina 59
Tabela 12	Resultados da PCR GAPDH, IS900 e F57 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco 60

LISTA DE ABREVIACOES

AEC	aminoetil-carbamazole
AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
BAARs	bacilos álcool-ácido resistentes
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	“ethylenediamine tetraacetic acid”
ELISA	“enzyme-linked Immunosorbant Assay”
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuria
HE	hematoxilina-eosina
HEYM	“Herrold Egg Yolk Medium”
IHQ	imuno-histoquímica
ISH	“In situ hybridization”
IS900	“insertion Sequence” 900
Labacvet	Laboratório de Bacteriologia Veterinária
LSAB	labeled streptavidin-biotin
Map	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
OIE	“Organization International des Epizooties”
pb	pares de base
PBS	“phosphate buffer solution”
PCR	“polimerase chain reaction”
pH	potencial hidrogeniônico
PSA	Projeto Sanidade Animal
RNA	ribonucleic acid
SAP	Setor de Anatomia Patológica
SDS	“sodium dodecyl sulfate”
Th	T “helper”
UFRGS	Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Paratuberculose	3
2.1.1 Agente etiológico	6
2.1.2 Epidemiologia	6
2.1.3 Imunopatogênese	7
2.1.4 Patogênese	8
2.1.5 Sinais clínicos	9
2.1.6 Diagnóstico	9
2.1.6.1 Testes sorológicos	9
2.1.6.2 Cultivo bacteriano	9
2.1.6.3 Achados de necropsia	10
2.1.6.4 Histopatologia	10
2.1.6.5 Imuno-histoquímica	10
2.1.6.6 Reação da polimerase em cadeia	11
2.1.7 Tratamento	11
2.1.8 Controle	12
2.1.8.1 Vacinas	12
2.1.9 Diagnóstico diferencial	12
2.1.9.1 Tuberculose	13
2.1.9.2 Deficiência de Cobre	13
2.1.9.3 Intoxicação por Flúor	13
2.1.9.4 Disenteria de Inverno	13
2.1.9.5 Diarreia Viral Bovina	13
2.1.9.6 Acidose láctica	13
2.1.9.7 Helmintoses	13
2.1.9.8 Intoxicação por polpa cítrica e <i>Vicia</i> sp	14
2.1.9.9 Intoxicação por <i>Brachiaria</i> spp	14
2.1.10 Doença de Crohn	14
2.2 Estudo sobre Fixadores de Tecido	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Coleta de fragmentos de tecido	17
3.1.1 Bovinos sintomáticos	17
3.1.2 Bovinos assintomáticos	17
3.2 Soluções fixadoras	18
3.2.1 Solução de formol a 10%	18
3.2.2 Solução de zinco	18
3.3 Histopatologia	18
3.3.1 Bovinos sintomáticos	18
3.3.2 Bovinos assintomáticos	18
3.4 Coloração de Ziehl-Neelsen	18
3.5 Imuno-histoquímica	19
3.6 Reação da Polimerase em Cadeia - PCR	19
3.6.1 Extração do DNA	20

3.6.1.1 Método do fenol-clorofórmio álcool-isoamílico	20
3.6.1.2 Método de extração de DNA por kit comercial	20
3.6.2 Espectrofotometria	20
3.6.3 Eletroforese do DNA extraído	20
3.6.4 PCR GAPDH	21
3.6.4.1 Sensibilidade da PCR GAPDH	21
3.6.5 PCR IS900 e F57	21
3.6.5.1 Sensibilidade do PCR IS900 e F57	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Bovinos do estudo	23
4.2 Sinais clínicos e macroscopia	23
4.2.1 Bovinos sintomáticos	23
4.2.2 Bovinos assintomáticos	26
4.3 Histopatologia	31
4.3.1 Animais sintomáticos e assintomáticos	31
4.3.1.1 Bovinos sintomáticos	31
4.3.1.2 Bovinos assintomáticos	31
4.3.2 Estudo dos fixadores / Manutenção da arquitetura histológica	39
4.3.2.1 Tecidos fixados em solução de zinco	39
4.3.2.2 Tecidos fixados em solução de formol a 10%	39
4.4 Coloração de Ziehl-Neelsen	42
4.4.1 Animais sintomáticos e assintomáticos	42
4.4.1.1 Bovinos sintomáticos	42
4.4.1.2 Bovinos assintomáticos	42
4.4.2 Estudo dos fixadores	42
4.5 Imuno-histoquímica	45
4.5.1 Animais sintomáticos e assintomáticos	45
4.5.1.1 Bovinos sintomáticos	45
4.5.1.2 Bovinos assintomáticos	45
4.5.2 Estudo dos Fixadores de tecido	48
4.5.2.1 Fragmentos fixados em solução de zinco	48
4.5.2.2 Fragmentos fixados em solução de formol	48
4.6 PCR	52
4.6.1 Animais sintomáticos e assintomáticos	52
4.6.2 Estudo dos fixadores de tecido	52
4.6.2.1 Eletroforese do DNA extraído	52
4.6.2.2 Pureza do DNA extraído de amostras fixadas	52
4.6.2.2.1 Extração por fenol-clorofórmio	52
4.6.2.2.2 Extração por kit-comercial	52
4.6.2.3 PCR GAPDH	58
4.6.2.3.1 Tecidos fixados em zinco	58
4.6.2.3.2 Tecidos fixados em formol	58
4.6.2.4 PCR IS900 e F57	58
4.6.2.4.1 Sensibilidade do teste	58
4.6.2.4.2 Amostras fixadas na solução de zinco	58
4.6.2.4.3 Amostras fixadas na solução de formol	58
5 DISCUSSÃO	63
5.1 Paratuberculose Subclínica	63

5.1.1 Macroscopia	63
5.1.1.1 Bovinos sintomáticos	63
5.1.1.2 Bovinos assintomáticos	64
5.1.2 Citopatologia da mucosa intestinal	64
5.1.3 Histopatologia	64
5.1.3.1 Bovinos sintomáticos	64
5.1.3.2 Bovinos assintomáticos	65
5.1.4 Coloração de Ziehl-Neelsen	65
5.1.5 Teste de imuno-histoquímica	66
5.2 Estudo dos Fixadores de Tecido	67
5.2.1 Histopatologia	67
5.2.2 Coloração de Ziehl-Neelsen	68
5.2.3 Imuno-histoquímica	68
5.2.3.1 Solução de zinco	68
5.2.3.2 Solução de formol a 10%	69
5.2.4 PCR GAPDH, IS900 e F57	69
5.2.4.1 Extração de DNA	69
5.2.4.1.1 Utilização de microesferas de vidro (“beadsbeating”)	70
5.2.4.1.2 Qualidade e pureza do DNA extraído por kit comercial e fenol clorofórmio	71
5.2.4.2 Solução fixadora x PCR	72
5.2.4.2.1 PCR de amostras fixadas em zinco	72
5.2.4.2.1 PCR de amostras fixadas em formol	73
6 CONCLUSÃO	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	
Anexo 1. Modelo da ficha com os dados e alterações histopatológicas de cada bovino	98
Anexo 2. Solução PBS (“Phosphate Buffer Saline”) utilizado neste estudo	100

1 INTRODUÇÃO

Paratuberculose ou doença de Johne é uma enteropatia granulomatosa infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), uma bactéria álcool-ácido resistente (BAAR) que invade e prolifera no citoplasma de macrófagos. A virulência atribuída ao Map é pouco conhecida, mas está relacionada à resistência à destruição pelos macrófagos através da inibição da maturação dos fagossomos (COUSSENS et al., 2010; DANIEL et al., 2006; SOUZA et al., 2007). A imunidade celular mediada possui papel importante no desenvolvimento das lesões na mucosa intestinal e no desencadeamento dos sinais clínicos (CLARKE, 1997). Na fase inicial da infecção, os animais são assintomáticos e eliminam pequenas quantidades da micobactéria; a infecção subclínica é caracterizada pela resposta imune celular mediada, e a resposta imune humoral nesta fase é insignificante; a fase clínica é caracterizada por forte resposta imune humoral e fraca resposta imune celular (BENDIXEN, 1978) e ocorre após os três anos de idade, associado a eventos de estresse (CLARKE, 1997). A dificuldade no diagnóstico da paratuberculose subclínica está relacionada, principalmente, à resposta imune paradoxal do animal frente aos diversos estágios da enfermidade (STABEL; ACKERMANN; GOFF, 1996), visto que, a maioria dos animais infectados não apresenta e não apresentará os sinais clínicos característicos da enfermidade ao longo de sua vida. Os testes laboratoriais disponíveis atualmente para o diagnóstico precoce da enfermidade são pouco satisfatórios (OIE, 2012; STABEL, 1998) e contribuem para a ineficiência das medidas de controle no rebanho. O desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas para a detecção da infecção no estágio latente ou subclínico da paratuberculose é necessário para o correto diagnóstico, assim como para auxiliar na melhoria dos métodos de controle da infecção e contribuir para minimizar a manutenção e disseminação do agente etiológico.

Dessa forma, neste estudo pretendeu-se:

(1) Detectar possíveis achados anátomo-histopatológicos e imuno-histoquímicos em intestino e linfonodos mesentéricos de bovinos provenientes de propriedades com histórico de paratuberculose, e avaliar as possibilidades de diagnosticar a enfermidade antes do aparecimento dos sinais clínicos;

(2) Detectar Map em intestino e linfonodos mesentéricos, fixados e incluídos em parafina, de bovinos assintomáticos oriundos de rebanho positivo para paratuberculose, através de PCR IS900 e F57;

Na segunda parte deste trabalho, foi realizado estudo comparativo de duas soluções fixadoras de tecidos. O principal objetivo da fixação de tecido é a preservação da histomorfologia, bem como promover a detecção de epítomos presentes na superfície ou no interior das células, através de técnicas de imuno-histoquímica (LUNA, 1968). Na maioria dos casos, a solução de formol a 10%, atende a esta necessidade e tem sido o fixador mais utilizado, durante décadas, na rotina de laboratórios de patologia. No entanto, com o rápido progresso da biologia molecular, nota-se crescente importância da preservação de proteínas e outras moléculas celulares tanto para o diagnóstico quanto para estudos retrospectivos. Tem sido amplamente descrito que a fixação pelo formol pode fragmentar ou comprometer a qualidade de macromoléculas e do DNA genômico, e impossibilitar a amplificação de fragmentos longos e a análise quantitativa dos ácidos nucleicos pelo teste PCR (“polymerase chain reaction”). A formação de “cross-link” ou entrelaçamento entre proteínas, macromoléculas e ou ácidos nucleicos, pelo formaldeído pode causar efeitos deletérios ou modificar a cadeia de DNA (JOHANSEN et al., 2004), além disso, é considerado uma substância potencialmente carcinogênica (INCA, 2012), o que torna necessário a sua utilização sob cuidados especiais (SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013). Estudos têm demonstrado que DNA, RNA e proteínas são melhor preservadas em soluções compostas por sais de zinco em comparação àqueles fixadas em soluções contendo aldeídos (LYKIDIS et al.,

2007), o que pode ser uma ferramenta importante para a manutenção de ácidos nucleicos e de macromoléculas para estudos genéticos e proteômicos, pelo fato de não causarem “cross-link” ou coagulação de proteínas e, inclusive por apresentar menor toxicidade e redução do descarte de resíduos químicos tóxicos. Alguns pesquisadores demonstraram que o zinco pode manter viáveis, inclusive, enzimas presentes em secções de tecidos para avaliação de sua atividade (JENSEN et al., 2010). Neste trabalho, foi realizado um estudo comparativo entre duas soluções fixadoras de tecido, um composto por formol e o outro por sais de zinco. O intuito deste estudo foi avaliar a manutenção da histomorfologia, a capacidade de detecção de bacilos álcool-ácido resistentes e antígenos de *Mycobacterium* spp. por imuno-histoquímica e amplificação de fragmentos de DNA de bovino por PCR GAPDH e de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* por PCR IS900 e F57, em secções de intestino e linfonodo mesentérico fixados, provenientes de bovinos com paratuberculose clínica. E ainda, foi realizada a comparação dos parâmetros acima descritos em fragmentos mantidos nas soluções fixadoras (zinco e formol) por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e também, entre duas metodologias de extração de DNA, uma por kit comercial e outra por fenol-clorofórmio, de amostras fixadas em zinco e em formol, e incluídas em parafina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Paratuberculose

A paratuberculose ou doença de Johne está presente nos cinco continentes, pertence à categoria das enfermidades transmissíveis de importância sócio-econômica e em saúde-pública, cujo controle é necessário para o comércio internacional de animais e alimentos de origem animal (OIE, 2012). O estudo da transmissão de Map entre os animais é realizado principalmente naquelas espécies comumente afetadas e em regiões em que a infecção representa importância econômica considerável; a bovinocultura leiteira é a mais afetada e, acredita-se que o mecanismo de transmissão do agente infeccioso possui padrão similar em outras espécies (MANNING; COLLINS, 2010). Os prejuízos estão relacionados principalmente à redução da produção de leite e do ganho de peso, baixa eficiência reprodutiva, abate prematuro e redução do valor da carcaça ao abate (HENDRICK et al., 2005; KUDAHL et al., 2010; OIE, 2012). É considerada uma potencial ameaça à indústria animal devido à sua natureza insidiosa (OIE, 2012); estimativas demonstraram que cerca de 50% dos rebanhos leiteiros europeus e da América do Norte estão infectados e nestas regiões a paratuberculose é considerada endêmica (MANNING; COLLINS, 2010). Nos EUA as perdas anuais causadas pela paratuberculose chegam a 250 milhões de dólares (LOSINGER, 2005).

A paratuberculose foi descrita pela primeira vez na Alemanha, em 1895, por Johne e Frothingam, como tuberculose atípica; na ocasião foram observadas lesões granulomatosas contendo BAARs em intestino de bovino. Em 1910, o microrganismo foi isolado em meio de cultivo e caracterizado como *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne* (TWORT, 1910; TWORT; INGRAM, 1912) e, atualmente é denominado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (THOREL; KRICHEVSKY; LEVY-FREBAULT, 1990). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em bovinos importados da Bélgica no ano de 1915, no estado do Rio de Janeiro, no então Posto Zootécnico Federal de Pinheiro, pelo Professor Octávio Dupont. Atualmente há descrições da enfermidade em vários estados e em diversas espécies (Tabela 1). Apesar do baixo número de rebanhos testados no país, as estimativas são relativamente altas, quando comparadas às taxas de prevalência internacionais, sendo necessários estudos para subsidiarem medidas de controle, uma vez que não há programa sanitário para a paratuberculose no Brasil (GOMES et al., 2002).

Tabela 1. Histórico da paratuberculose no Brasil (Continua)

Ano	Autores	Cidade/Estado	Espécie	Observações
1915	Dupont	Rio de Janeiro	Bovino	Animal importado da Bélgica, Posto Zootécnico Federal em Pinheiral
1956	Santos e Silva	Barra Mansa, Rio de Janeiro	Bovino	Touro importado da Holanda, exames clínicos e anátomo-histopatológicos
1960	Darcorso Filho et al.	Petrópolis e Bangu, Rio de Janeiro	Bovino	Exames clínicos e anátomo-histopatológico
1961	Silva e Pizelli	Petrópolis, Rio de Janeiro	Bovino	Exames necroscópico e bacteriológico de esfregaços de fezes, mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos
1961	Silva	Não informado	Não informado	Cultivo bacteriano em meio Hohn. Primeiro isolamento da micobactéria no Brasil, a partir de suspensões de gânglios linfáticos mesentéricos
1968	Silva	Não informado	Ovino	Teste intradérmico com jonina. Reprodução da doença em ovinos através da inoculação via oral de Map proveniente de bovino infectado
1979	Portugal et al.	Brusque e Florianópolis , Santa Catarina	Bovino	Teste intradérmico PPD mamífera e aviária. Exames clínico, anátomo-histopatológicos e cultivo bacteriano. Touro nacional e vaca importada da Holanda.
1986	Ramos et al.	Rio Grande do Sul	Bovino	Teste intradérmico com jonina. Isolamento em HEYM com micobactina e exames clínicos, anátomo-histopatológicos
1991	Nakajima et al.	Juiz de Fora, Minas Gerais	Bovino	Vaca importada dos EUA, oriunda do estado do Paraná
1994	Poester e Ramos	Rio Grande do Sul	Caprino	Teste intradérmico com jonina, exames anátomo-histopatológicos. Reprodução da doença através de inoculação oral de emulsão de mucosa intestinal de bovino com paratuberculose
1996	Riveira	Mato Grosso do Sul e São Paulo	Bovino	ELISA indireto
1999	Driemeier et al.	Capela de Santana, Rio Grande do Sul	Bovino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos e isolamento em HEYM com micobactina
2000	Fonseca et al.	São Paulo	Bovino	ELISA
2001	Ferreira et al.	Rio de Janeiro	Bovino	ELISA
2002	Gomes et al.	Capela de Santana, Rio Grande de Sul	Bovino	ELISA, IDGA, isolamento do agente em HEYM com micobactina
2002	Castro et al.	Paraíba	Bovino	Isolamento do agente em HEYM com micobactina
2003	Cunha et al.	Goiás	Bovino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos
2003	Ferreira et al.	Resende, Rio de Janeiro	Bovino	ELISA, isolamento do agente em HEYM com micobactina, histopatologia
2005	Silva	Pará	Bovino	Bovinos de corte, ELISA

Tabela 1. Continuação

2005	Acypreste et al.	Goiânia, Goiás	Bovino	ELISA
2005	Rodrigues	Resende, Rio de Janeiro	Bovino	Exames clínicos, anátomo-histopatológicos, imunohistoquímica, isolamento em HEYM com micobactina e, ELISA e PCR F57
2007	Ristow et al.	Rio de Janeiro	Bovino	ELISA, Isolamento microbiano em HEYM com micobactina e exames clínicos e anátomo-histopatológicos
2007	Mota et al.	Região da Zona da Mata , Pernambuco	Bovino	ELISA, isolamento do agente, exames clínicos e anátomo-histopatológicos
2008	Oliveira et al.	Paraíba	Bovino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos
2008	Carvalho	Viçosa, Minas Gerais	Bovino	Isolamento em HEYM com micobactina, ELISA, PCR IS900 e ISMav2, sequenciamento do Map
2009	Mota et al.	Paraíba	Bovino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos e isolamento em HEYM com micobactina
2009	Jacinto et al.	Espírito Santo do Pinhal, São Paulo	Caprino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos. Animal procedente de Farroupilha, RS
2010	Costa et al.	Espírito Santo	Bovino	ELISA
2010	Barbosa et al.	Maranhão	Bubalino	Exames clínicos e anátomo-histopatológicos
2010	Mota et al.	Pernambuco	Bubalino	Isolamento do agente, exames clínicos e anátomo-histopatológicos, PCR IS900
2010	Oliveira et al.	Paraíba	Caprino e ovino	Teste intradérmico PPD mamífera e aviária. Exames clínicos e anátomo-histopatológicos e imunohistoquímica
2010	Yamasaki et al.	Rio Claro, Rio de Janeiro	Bovino	Teste intradérmico PPD mamífera e aviária. ELISA, exames clínicos e anátomo-histopatológicos, isolamento do agente em HEYM com micobactina, PCR IS900
2012a	Medeiros et al.	Paraíba	Caprino e ovino	ELISA, isolamento em HEYM com micobactina
2012b	Medeiros et al.	Paraíba	Bovino	ELISA
2012	Carvalho et al.	Viçosa, Minas Gerais	Bovino	PCR IS900, clonagem e sequenciamento genético
2012	Dalto et al.	Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul	Bubalino	ELISA, isolamento do agente em HEYM com micobactina, exames clínicos e anátomo-histopatológicos, imunohistoquímica, PCR IS900

2.1.1 Agente etiológico

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, é um bacilo álcool-ácido resistente pertencente à família Mycobacteriaceae, Gram-positivo, intracelular e cultivável, que apresenta crescimento lento, com tempo de duplicação “in vitro” entre 22 e 26 horas (BANNANTINE et al., 2003); quando observado ao microscópio, geralmente apresenta-se em pequenos aglomerados. Sob condições, ótimas, são necessárias, aproximadamente, 16 semanas para se formarem colônias visíveis (OIE, 2012). O longo período de tempo necessário para o seu crescimento em meio de cultivo é uma das grandes desvantagens e limita a sua utilização para o diagnóstico rotineiro. O sucesso do isolamento do Map depende de vários 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 (COLLINS et al., 2006; STABEL, 1997; TIMMS et al., 2011), desta forma, as taxas de prevalência podem ser subestimadas quando determinadas por esta técnica. Os meios de cultivo comumente utilizados são Herrold egg yolk medium (HEYM), meio de Dubbos modificado, Middlebrook e Löwenstein-Jensen acrescidos de micobactina (KLANIKOVA et al. 2012; OIE 2012). Como outras micobactérias, possui parede celular espessa, composta principalmente por lipídeos (THOREL; KRICHEVSKY; LEVY-FREBAULT, 1990) o que lhe confere alta resistência a processos químicos, como cloração da água (WHAN et al., 2001) e físicos, como a pasteurização (GRANT et al., 1999).

2.1.2 Epidemiologia

A epidemiologia e patogênese da doença de Johne estão amplamente descritas; afeta principalmente bovinos e foi relatada em ovinos, caprinos, ruminantes silvestres, equinos, suínos, coelhos e raposas (OIE, 2012; MANNING; COLLINS, 2010). Os animais se infectam, tipicamente, nos primeiros meses de vida pela via orofecal no momento da ingestão de colostro ou leite, quando entra em contato com o úbere contaminado com fezes contendo a micobactéria (BEGG; WHITTINGTON, 2007; MANNING; COLLINS, 2010). No entanto, há evidências de infecção intrauterina de vacas 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 da corrente linfática (BUERGELT et al., 2006; CHIODINI, VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; WHITTINGTON; WINDSOR, 2009); nestes casos o Map pode ser isolado em meio de cultivo através do colostro e do leite (MANNING; COLLINS, 2010; SWEENEY, 1996). A transmissão entre animais adultos é pouco comum, porém tem sido relatada (CLARKE; GRIFFIN; MACKINTOSH, 2010; CLARKE; GRIFFIN; MACKINTOSH, 2011; KURADE et al., 2004) e, apesar dos indivíduos desta faixa etária serem mais resistentes à infecção e menos susceptíveis ao desenvolvimento dos sinais clínicos, podem se tornar carreadores e eliminar periodicamente o Map no ambiente. Os bovinos que adoecem são, normalmente, aqueles que se infectaram nas primeiras semanas de vida (HAGAN, 1938); dos animais infectados, poucos desenvolvem a doença e outros, em sua maioria, eliminam o agente sem apresentar os sinais clínicos da enfermidade (MANNING; COLLINS, 2010). Um aspecto singular da paratuberculose entre as infecções micobacterianas é a aparente susceptibilidade à infecção dependente da idade; a dose infectante para neonatos possivelmente é menor em relação à dose infectante para indivíduos adultos. A base biológica deste mecanismo não é conhecida, mas provavelmente está relacionada à entrada do Map no organismo hospedeiro

através do tecido linfoide intestinal, conhecido como placas de Peyer (MANNING; COLLINS, 2010; MOMOTANI et al., 1988). Sabe-se que, em casos clínicos, a eliminação de Map nas fezes é maior em relação aos animais assintomáticos e pode ocorrer em qualquer fase da infecção; porém, a bactéria é raramente detectada antes dos dois anos de idade (CLARKE, 1997). O período de incubação varia de 2 a 5 anos; neste período alguns indivíduos do rebanho podem eliminar o Map e, com as metodologias existentes para detecção de animais infectados, é impossível a distinção entre animais que tiveram prévio contato com o Map e eliminaram o agente infeccioso daqueles que permanecem infectados, na fase subclínica período em que a progressão da infecção está controlada (STABEL, 2010).

2.1.3 Imunopatogênese

Os mecanismos de interação entre hospedeiro e patógeno são complexos, interligados e relacionados intimamente quanto às características genéticas, moleculares e celulares do organismo animal. As defesas do hospedeiro compreendem reações específicas e não específicas de eliminação do agente infeccioso; o patógeno por sua vez, utiliza táticas de evasão e obstrução do sistema imune hospedeiro para assegurar a sua sobrevivência. Micobactérias podem infectar várias espécies animais, e de acordo com a circunstância, podem ativar uma eficiente resposta imune do hospedeiro ou desencadear uma enfermidade crônica com lesões que variam desde reações de hiperssensibilidade acentuada a lesões aparentemente tolerantes à grande quantidade de bactérias (CLARKE, 1997).

A imunidade específica contra micobactérias é essencialmente celular mediada; os anticorpos possuem eficácia limitada contra estes agentes e a sua destruição está principalmente relacionada a mecanismos intracelulares de eliminação através de macrófagos infectados (CLARKE, 1994; STABEL, 2010). À semelhança de um patógeno intracelular, o Map é capaz de sobreviver no interior dos macrófagos através da inibição da maturação do fagossomo; este mecanismo também tem sido relatado em outras espécies micobacterianas, associado à inibição da acidificação do fagossomo (KUEHNEL et al. 2001; WEISS et al., 2004; WEISS et al., 2005). Visto que, a acidificação do fagossomo-lisossomo possibilita a produção de substâncias bactericidas pela célula, tais como o óxido nítrico, complexos de oxigênios reativos (H_2O_2 e OH^-) e hidrolase lisossomal, este mecanismo reduz a replicação intracelular de micobactérias. A produção destes compostos pelas células infectadas pode ser comprometida quando expostas ao Map, onde ocorre a inibição à destruição do agente infeccioso em ambiente intracelular (MILLER et al. 2004; DANIEL et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Uma vez infectado, os macrófagos são ativados e inicia-se o processo de produção de interleucina-1 (IL-1), um mensageiro celular que ativa as células T simultaneamente à apresentação do antígeno (HOPE et al., 2004; STABEL, 2010). Em seguida, linfócitos T ativados produzem IL-2, resultando na expansão clonal de células T citolíticas $CD8^+$ e populações de células T helper $CD4^+$. Durante a ativação de células T, os macrófagos e as moléculas da classe II do MHC, apresentam o antígeno às células $CD4^+$ e os antígenos associados com moléculas da classe I do MHC são apresentados às células $CD8^+$. A população de linfócitos Th1 produz IL-2, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, citocinas que direcionam para a função imune celular mediada (STABEL, 2010) e, a subpopulação Th2 de linfócitos é responsável pela indução da resposta imune humoral, ou seja, estágio mais adiantado da infecção, via citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, caracterizado pela expansão dos linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e controle das respostas Th1-mediada (MOSMANN; COFFMAN, 1989; STABEL, 2010). Determinados antígenos (virais ou bacterianos) podem preferencialmente ativar a imunidade celular mediada, a imunidade humoral ou ambas.

Lesões granulomatosas em intestino são características da infecção pelo Map e a composição do tipo celular está associada ao estágio da infecção (STABEL, 2010); a severidade da lesão está associada com a intensidade da resposta imunológica local. A progressão da doença, da fase assintomática para a fase clínica, tem sido associada à diminuição de células T CD4+ e aumento das células T $\gamma\delta$ na lâmina própria do íleo, com nenhuma diferença na frequência das células de bovinos infectados assintomáticos e não infectados (KOETS et al. 2002; STABEL, 2010; VALHEIM et al., 2004). Um aumento nas células T CD8+, concomitante à redução do número de células T CD4+, tem sido relatado em caprinos com paratuberculose clínica (NAVARRO et al., 1998). O padrão da expressão da citocina no tecido intestinal é influenciado pelo estágio da infecção (COUSSENS et al., 2004; KALIFEH; STABEL, 2004; TANAKA et al., 2005) e mostra claramente o paradigma Th1-Th2, à semelhança de outras doenças micobacterianas tais como lepra e tuberculose (STABEL, 2010)

As respostas imunológicas durante a fase clínica não são bem conhecidas; geralmente observa-se uma relação inversa entre a imunidade celular e humoral, e no final da infecção, ou seja, na fase terminal da doença, ocorre a anergia, em que não é possível detectar nem a imunidade celular nem a imunidade humoral (CHIODINI; KRUIINGEN; MERKAL, 1984, STABEL, 2010). Nesta fase, macrófagos infectados podem alcançar a corrente circulatória e provocar bacteremia e disseminação do micorganismo para o fígado, rins, pulmões, trato reprodutor e úbere (CLARKE, 1997; SWEENEY; WHITLOCK; ROSENBERGER, 1992; COUSSENS et al., 2010). Como em outras micobacterioses é considerada uma doença dinâmica em que 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). Vale ressaltar que a exposição à micobactérias saprófitas presentes no ambiente, pode sensibilizar o rebanho resultando em reações de hipersensibilidade do tipo tardia não específica.

2.1.4 Patogênese

Após a ingestão, o Map é fagocitado pelas células M, que têm a função de recobrir as placas de Peyer e transportar antígenos da barreira epitelial do lúmen intestinal para o tecido linfóide. As células M são a via de infecção para alguns patógenos e porta de entrada do antígeno para iniciar as respostas imunológicas de proteção (MOMOTANI et al., 1988). As micobactérias são transferidas da lâmina própria da mucosa do íleo para os macrófagos (MOMOTANI et al., 1988), e a maioria resiste à digestão pelo fagolisossomo e multiplicam-se livremente (BENDIXEN; BLOCK; JORGENSEN, 1981; STABEL, 2010). A imaturidade dos macrófagos em animais jovens associado ao maior volume de tecido linfóide intestinal organizado no íleo pode ser uma das causas da susceptibilidade à infecção dos animais jovens (MOMOTANI et al., 1988). A tentativa dos macrófagos em conter, sem sucesso, a multiplicação intracelular dos bacilos, resulta na liberação de fatores solúveis, os quais recrutam novas células inflamatórias para o local. O efeito da invasão tecidual pelos bacilos é a multiplicação dos macrófagos e consequente formação atípica de granulomas nos segmentos mediano e distal do intestino delgado, característica da doença de Johne (TIWARI et al., 2006; COUSSENS et al., 2010). Além disso, Map não produz toxinas ou fatores de virulência e não causa danos celulares; 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, o que pode comprometer a absorção de nutrientes, a vascularização e a drenagem linfática (CHIODINI; KRUIINGEN; MERKAL, 1984; COUSSENS et al., 2010).

2.1.5 Sinais clínicos

A manifestação dos sinais clínicos ocorre em animais adultos e afeta, em média, 10% do rebanho. A mortalidade é menor que 1% ao ano e estima-se que para cada caso clínico existam entre 15 e 25 animais subclínicos (SWEENEY, 1996; OLSEN; SIGURDARDOTTIR; DJONNE, 2002). A sintomatologia típica ocorre em bovinos a partir de dois anos de idade, normalmente naqueles animais que se infectaram nos primeiros meses de vida; quando se inicia a manifestação clínica, a enfermidade encontra-se já na sua fase terminal e resulta em morte do animal. Apesar de os animais apresentarem apetite normal ou exacerbado, observa-se perda progressiva de peso, desidratação, diarreia intermitente, profusa, homogênea, semifluida ou líquida, não responsiva a tratamentos e que, progressivamente, em bovinos, torna-se contínua e eliminada sob forma de jato. O acentuado acúmulo de células inflamatórias, principalmente na mucosa e submucosa intestinal, desencadeia a chamada síndrome da má absorção, o que diminui a assimilação de nutrientes, reduz a produtividade e causa o declínio da condição corporal (BUERGELT et al., 1978; CHIODINI et al., 1984; CLARKE, 1997).

2.1.6 Diagnóstico

A fase clínica da paratuberculose pode ser diagnosticada através da observação dos sinais clínicos típicos e confirmada pela demonstração de Map nas fezes através da microscopia (coloração para evidenciação de BAARs), do isolamento do agente em meio de cultivo específico ou pela detecção de DNA da micobactéria. À necropsia, pode ser diagnosticada pela observação de lesões patognômicas da doença no intestino e demonstração de BAARs em esfregaços, histologia e ou isolamento de Map em cultivo bacteriano específico (OIE, 2012).

A fase subclínica da infecção pode ser detectada através da sorologia ou do isolamento do Map em cultivo bacteriano, a partir de fezes ou tecidos coletados à necropsia. Outra metodologia utilizada é o teste do interferon-gama para demonstrar a resposta celular mediada. A escolha da técnica laboratorial depende das circunstâncias e do grau de sensibilidade diagnóstica necessária para detecção da infecção em nível individual ou de rebanho (OIE, 2012). No entanto, a ineficiência dos testes laboratoriais para detecção dos animais infectados e assintomáticos é o principal obstáculo no diagnóstico e controle da doença de Johne (OLSEN; SIGURDARDOTTIR; DJONNE, 2002; SIGURDARDOTTIR, et al., 1999).

2.1.6.1 Testes sorológicos

Os testes sorológicos comumente utilizados para detecção da resposta humoral contra a doença de Johne são o ELISA, imunodifusão em ágar-gel e fixação de complemento e para detectar a imunidade celular utiliza-se o teste de interferon gama (OIE, 2012). Há uma grande variedade de testes utilizados para diagnóstico presuntivo da paratuberculose, no entanto, quando comparado ao cultivo fecal, nenhum deles é sensível o suficiente para detectar a infecção subclínica (OLSEN; SIGURDARDOTTIR; DJONNE, 2002; TIWARI et al., 2006).

2.1.6.2 Cultivo bacteriano

Os meios de cultivo comumente utilizados são Herrold egg yolk medium (HEYM), meio de Dubbos modificado, Middlebrook e Löwenstein-Jensen acrescidos com micobactina (MERKAL, 1970; SMITH 1953; JORGENSEN 1983, OIE 2012). As características

morfológicas das colônias de Map dependem do meio utilizado; em HEYM observam-se pequenas colônias com cerca de 2mm de diâmetro, convexas e lisas, enquanto que, no Middlebrook apresentam-se com aspecto rugoso. Sob condições ótimas, são necessários aproximadamente quatro meses para se tornarem visíveis (COLLINS, 2003).

A dependência do Map à micobactina tem sido amplamente utilizada como sua característica taxonômica, no entanto, a maioria das micobactérias não produz esta substância. *M. paratuberculosis*, *M. silvaticum* e alguns isolados primários de *M. avium* não possuem a capacidade de produzir a micobactina e dependem da sua adição para crescer em meio de cultivo. Portanto a dependência à micobactina não se restringe apenas ao Map (THOREL, 1991).

2.1.6.3 Achados de necropsia

Nos casos avançados da doença de Johne observam-se à necropsia, vasos linfáticos proeminentes, esbranquiçados e com aspecto tortuoso, que pode se estender da serosa intestinal até o mesentério; é um achado macroscópico que conduz ao diagnóstico presuntivo da paratuberculose à necropsia. Lesões mais específicas ocorrem no intestino delgado e, em casos mais graves, se estendem desde o duodeno até o reto; caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, em que a mucosa adquire aspecto cerebroide e/ou anelado devido à formação de rugas e pregas transversais, além disso, apresenta aspecto microgranular em sua superfície (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; CHIODINI et al., 1984). Os linfonodos mesentéricos encontram-se edematosos, aumentados de tamanho e ao corte, protrai e flui grande quantidade de líquido leitoso (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; DRIEMEIER et al., 1999; YAMASAKI et al., 2010).

2.1.6.4 Histopatologia

Em bovinos com sinais clínicos da enfermidade e com lesões difusas, foram denominadas duas classificações: forma “paucibacillary” ou tuberculoide e “multibacillary” ou lepromatosa. Na forma “paucibacillary” ou tuberculoide, o infiltrado inflamatório é composto de linfócitos e alguns macrófagos contendo poucas micobacterias; esta forma está relacionada à marcada resposta imune celular e corresponde ao início ou fase latente da infecção. Na forma “multibacillary” ou lepromatosa há intensa infiltração granulomatosa com formação de células gigantes de Langhans que contém inúmeras BAAR em mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso, com proliferação fibroblástica ao redor dos plexos nervosos de Meissner e de Auerbach; na subserosa encontram-se linfangiectasia e linfangite granulomatosa. As secções dos linfonodos mesentéricos apresentam igualmente, lesões de natureza granulomatosa, na zona cortical, paracortical e medular, e presença de BAAR. Esta forma está associada à forte resposta humoral. (BUERGELT et al., 1978, CHIODINI et al., 1984, CLARKE, 1997; DACORSO-FILHO et al., 1960; DRIEMEIER et al., 1999; GONZALEZ et al., 2005; CARRIGAN, SEAMAN, 1999; PÉREZ; GARCÍA-MARÍN; BADIOLA, 1996; YAMASAKI et al., 2010).

2.1.6.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

O teste de IHQ, tanto de doenças infecciosas quanto de neoplasias, em tecidos congelados ou fixados em formol tem sido utilizado com frequência no diagnóstico veterinário (WEBSTER et al., 2010). Apresenta grandes vantagens principalmente na detecção de agentes infecciosos. Em alguns casos, o teste apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo a técnica considerada “gold standart”, como por exemplo, em doenças

causadas por príons. A presença “in situ” do agente infeccioso e ou antígeno pesquisado, proporciona maior acurácia ao diagnóstico e auxilia na compreensão da patogênese (BREES et al., 2000; DABBS, 2010; WEBSTER et al., 2010); além disso, minimiza as possibilidades de diagnóstico falso-positivo devido à imunorreações inespecíficas. Outra vantagem da IHQ é a realização da técnica em tecidos fixados e incluídos em parafina, o que permite a detecção de antígenos em situações em que não há disponibilidade de tecidos frescos ou agentes infecciosos que não são comumente cultiváveis em laboratórios; e ainda, possibilita a realização de estudos retrospectivos quando há disponibilidade de arquivos de tecidos incluídos em parafina (WEBSTER et al., 2010).

2.1.6.6 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A PCR é um teste rápido e específico, mas ainda não sensível o suficiente para detecção de DNA em casos contendo poucos BAARs (GWOZDZ et al., 1997). A sensibilidade do teste depende da eficiência do isolamento do DNA a partir de amostras clínicas, das condições da amplificação e do método de detecção dos produtos da PCR. No entanto aproximadamente 10^{10} cópias de fragmentos com 100pb são necessários para tornar possível a visualização das bandas no gel (ALTWEGG, 1995). Além disso, a especificidade também é questionável. Portanto, a especificidade e sensibilidade do teste PCR devem ser melhoradas através de modificações e adições de etapas nos protocolos já descritos, tais como, o real-time PCR, métodos de hibridização, determinação de produtos da PCR com enzimas de restrição, sequenciamento, PCR-ELISA e ou nested-PCR (EELES; WARREN; STAMPS, 1992; POLJAK; SEME; KOREN, 1996).

Diversos autores propuseram métodos de diagnóstico molecular em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (GOELZ et al., 1985; BEN-EZRA et al., 1991; BARCELOS; FRANCO; LEÃO, 2008); a técnica oferece vantagens em relação à identificação convencional através do cultivo dependente de micobactina (COUSINS et al., 1999). MCFADDEN et al. (1987a, 1987b) identificaram o elemento de inserção denominado IS900 no genoma do Map; há de 15 a 20 cópias e seu tamanho equivale a 1451pb do qual 66% é G + C (COLLINS et al., 1999; GREEN et al., 1989). No entanto, Map está intimamente relacionado com organismos ambientais do complexo *M. avium*, particularmente *M. avium* subsp. *avium* o qual apresenta 97% de homologia do DNA de isolados de Map e o IS900 já foi confirmado em *Mycobacterium* sp. (ENGLUND; BÖLSKE; JOHANSSON, 2002; BANNANTINE et al., 2002; COUSINS et al., 1999). Nestes casos sugere-se a utilização de enzima de restrição nas amostras positivas para confirmar se a sequencia amplificada é compatível com Map (COUSINS et al., 1999).

A PCR tem sido utilizada para detectar a presença de Map no leite “in natura” (BÖLSKE, HERTHNEK, 2010; CARVALHO, 2008), fezes de bovinos (ALINOVI et al., 2009; BÖLSKE, HERTHNEK, 2010; PINEDO et al., 2008), sangue periférico de bovinos (BUERGELT, WILLIAMS, 2004; JUSTE et al., 2005; Bhide et al., 2006, KHOL et al., 2010), raspado intestinal de bovinos e búfalos (KHAN et al., 2010), sêmen de bovinos (HERTHNEK et al., 2006) e búfalos (KHOL et al., 2010) e em intestino de seres humanos com a doença de Crohn (SANDERSON et al., 1992).

As sequências de DNA denominadas ISMap2, ISMap2 e f57 são consideradas específicas para Map e não há relatos da sua ocorrência em outras micobactérias (BANNANTINE et al., 2005, STROMMENGER; STEVENSON; GERLACH, 2001, VANSNICK et al., 2004).

2.1.7 Tratamento

Não há tratamento comprovado contra a paratuberculose (NRCNA, 2003). O uso de drogas antimicobacterianas ameniza os sinais clínicos e a excreção do microrganismo pelas fezes, porém não é capaz de eliminar completamente a infecção (JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997).

2.1.8 Controle

O controle da doença é deficiente devido à natureza insidiosa da doença de Johne, ao lento desenvolvimento das lesões intestinais e à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos disponíveis, particularmente na população de animais infectados e assintomáticos (CHIODINI, VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; COCITO et al., 1994; NRCNA, 2003; OIE, 2012). As medidas de controle frequentemente preconizadas se referem à eliminação de vacas com sinais clínicos, rotina de higiene das instalações, separação de bezerras dos animais adultos e fornecimento de colostro e leite proveniente vacas negativas para paratuberculose (CHIODINI et al., 1984), aquisição de animais oriundo de rebanho livre de paratuberculose, bem como a realização de testes sorológicos semestrais para identificar e abater os animais reativos (THOEN; HAAGSMA, 1996).

2.1.8.1 Vacinas

As vacinas reduzem a manifestação dos sinais clínicos e a quantidade de microrganismos eliminados nas fezes (SHERMAN, 1987; JORGENSEN, 1984); é empregada em regiões onde a paratuberculose causa perdas econômicas significativas (HUYGEN; BULL; COLLINS, 2010). É provável que os fatores inerentes à formulação das vacinas têm reduzido à indução dos mecanismos celulares inato e adaptativo essenciais para eliminação efetiva de Map na infecção primária, particularmente na susceptibilidade dos animais neonatos e supressão da resposta imune frente à infecção, o que minimiza, desta forma, o aparecimento dos sinais clínicos (HUYGEN; BULL; COLLINS et al., 2010; NIELSEN; TOFT, 2008). A maioria dos programas de controle para a paratuberculose prioriza a redução da intensidade dos sinais clínicos, pois a erradicação da infecção do rebanho parece ser uma tarefa inviável, devido em parte, à insensibilidade dos testes diagnósticos; a permanência de animais infectados no plantel atua com fonte de infecção de novos animais (HUYGEN; BULL; COLLINS et al., 2010; NIELSEN; TOFT, 2008).

A implementação de programas de vacina pode ser uma alternativa em determinados países, porém, não têm sido alcançadas formulações de vacinas que forneçam proteção a todos os animais do rebanho, que previna a eliminação de Map ou ainda, que confira total proteção contra a infecção. As vacinas frequentemente causam a formação de grandes granulomas no local da inoculação (WINDSOR; EPPLESTON, 2006) e induzem às reações cruzadas com anticorpos contra tuberculina bovina. Sua maior desvantagem é a forte interferência nos resultados dos testes imunológicos o que impossibilita a distinção entre animais com paratuberculose e tuberculose bovina (COCITO et al., 1994; JORGENSEN, 1984; MUSKENS et al., 2002; OIE, 2012) e com isso, pode interferir no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (MAPA, 2006).

2.1.9 Diagnóstico diferencial

Diagnóstico diferencial com outras enfermidades que causam inflamação granulomatosa, emagrecimento progressivo e ou diarreia devem ser considerados.

2.1.9.1 Tuberculose

Na tuberculose, apesar do emagrecimento progressivo, em geral não há diarreia e há predominância de granulomas de natureza necrótico-caseosos, com frequência mineralizados, em diversos órgãos, especialmente no pulmão (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007, MCGAVIN; ZACHARY, 2007).

2.1.9.2 Deficiência de cobre

Diarreia em bovinos adultos é um sinal clínico inespecífico; tal disfunção pode ser observada na deficiência de cobre secundária ao excesso de molibdênio (MAZOCCO et al., 2009, TOKARNIA et al., 2010), associado com despigmentação dos pelos ao redor dos olhos, anemia e diminuição do apetite, sinais comumente ausentes na doença de Johne, na qual o apetite está normal ou até exacerbado, mesmo em estágios mais avançados da infecção.

2.1.9.3 Intoxicação por flúor

A diarreia intermitente, perda de peso, produção de leite diminuída e más condições gerais, sinais comumente observados na paratuberculose clínica, podem ocorrer também na intoxicação por flúor, no entanto, os animais com fluorose desenvolvem o escurecimento dos dentes e claudicação (RIET-CORREA et al., 1983), estes sinais, em geral, são ausentes na paratuberculose.

2.1.9.4 Disenteria de inverno (coronavírus)

Na infecção por coronavírus (disenteria de inverno), à semelhança da paratuberculose, observa-se diarreia aquosa e afeta animais adultos, mas ocorre sob forma de surtos que perdura por aproximadamente uma semana (PAVARINI et al., 2008); ao contrário dos animais com paratuberculose, que apresentam diarreia crônica e intermitente.

2.1.9.5 Diarreia viral bovina

Na diarreia viral bovina (BVD) os animais podem apresentar quadro clínico semelhante ao da paratuberculose, no entanto está associada à anorexia, febre, afeta animais de todas as idades e em geral, a morbidade e letalidade são elevadas (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007). Na paratuberculose não há febre, o rebanho apresenta baixa mortalidade e a sintomatologia aparece em animais a partir dos três anos de idade.

2.1.9.6 Acidose láctica

A acidose láctica, também pode causar diarreia em animais adultos, mas trata-se, em geral, de um quadro associado à ingestão excessiva de carboidratos não estruturais, tais como amido e sacarose (MCGAVIN; ZACHARY, 2007).

2.1.9.7 Helmintoses

As parasitoses gastrointestinais, apesar de cursarem com diarreia crônica, são raras em animais adultos e, quando ocorrem, geralmente estão associadas a fatores que causam queda de imunidade, tais como deficiências nutricionais graves, principalmente deficiência de

fósforo (TOKARNIA et al., 2010). Os animais com sinais clínicos da paratuberculose em geral, são vacas adultas que se alimentam normalmente, porém apresentam emagrecimento.

2.1.9.8 Intoxicação por polpa cítrica e *Vicia* spp.

Em algumas situações, a ingestão de polpa cítrica e de *Vicia* spp., pode causar inflamação granulomatosa em vários órgãos (BRACARENSE et al. 1999; BARROS et al., 2001; GAVA et al., 1999), enquanto que na paratuberculose a infiltração granulomatosa está presente principalmente em intestino e linfonodos mesentéricos, e é rara ou ausente em outros órgãos.

2.1.9.9 Intoxicação por *Brachiaria decumbens*

Na intoxicação por *Brachiaria decumbens*, também tem sido relatada a ocorrência de macrófagos espumosos nos linfonodos (DRIEMEIER et al., 1998), porém a coloração de ZN resulta negativa, além do quadro clínico ser diferente.

2.1.10 Doença de Crohn

A importância da doença de Johne na saúde pública se deve à sua possível associação com a doença de Crohn (CROHN; GINZBURG; OPPENHEIMER, 1932; HERMON-TAYLOR, 2001; GRANT, 2005; OKURA; TOFT; NIELSEN, 2012) que se caracteriza por inflamação granulomatosa em qualquer porção do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus, no entanto, as lesões são observadas comumente, na região do íleo terminal que, por vezes, são acompanhadas de úlceras e fístulas (SELBY, 1999) e se estendem para os linfonodos intestinais e vasos linfáticos regionais. Similaridades entre a paratuberculose e a doença de Crohn foram observadas por Dalziel em 1913, e posteriormente por Crohn et al. em 1932. Os sinais clínicos, em geral, se caracterizam por perda crônica de peso, dor abdominal e diarreia (CHIODINI, 1989). Apesar de sua etiologia ser desconhecida, evidências epidemiológicas indicam que a exposição de indivíduos geneticamente susceptíveis durante a infância, a determinados fatores microbiológicos, químicos e/ou ambientais, favorecem o desenvolvimento da doença.

Pesquisadores têm relatado a presença de Map no leite cru e pasteurizado (AYELE et al., 2005; GRANT; BALL; ROWE, 2002; SLANA et al., 2008; OKURA; TOFT; NIELSEN, 2012); além disso, a micobactéria foi detectada no sangue de pacientes com a doença de Crohn (NASER et al., 2004). Esta possível relação com a enterite em seres humanos é polêmica; tratamentos com drogas imunossupressoras e remoção cirúrgica da porção intestinal afetada são recomendados para controlar os sintomas e não se conhecem métodos curativos da enfermidade. Ainda são necessários estudos epidemiológicos amplos, com a utilização de modernas técnicas moleculares para desvendar a real causa da doença de Crohn e determinar se o Map tem significado etiológico primário ou se é apenas um invasor secundário (AUSTSCHBACH et al., 2005; COLLINS et al., 2000; MOMOTANI et al., 2012; NASER et al., 2004; SINGH et al., 2010). Até o presente momento, a paratuberculose não é considerada uma zoonose (OIE, 2012).

2.2 Estudo sobre Fixadores de Tecidos

A patologia molecular visa integrar ferramentas da biologia molecular às já conhecidas técnicas de rotina histopatológica, citopatológica e imuno-histoquímica na identificação e caracterização de agentes infecciosos ou alterações gênicas. Fornece os meios

mais precisos de diagnóstico e possibilita a compreensão do papel da expressão genética na etiologia das doenças. O progresso do estudo molecular, nas últimas décadas, permite a sua utilização não só na pesquisa, mas também na rotina diagnóstica dos laboratórios de anatomia patológica.

Tecidos fixados e incluídos em parafina são facilmente disponíveis nos arquivos de laboratórios de patologia; geralmente são mantidos por décadas e representam uma potencial fonte de material biológico para estudos genéticos e moleculares retrospectivos (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). Estas amostras possibilitam a análise conjunta dos achados histopatológicos e moleculares e, se disponível, complementação com informações sobre o histórico, alterações clínicas, macroscopia e resposta terapêutica de cada caso. Assim, a correlação dos dados disponíveis pode fornecer subsídios para caracterização detalhada da evolução da patologia e enriquecer as estratégias para o desenvolvimento de novas drogas e ou tratamentos paliativos, com o intuito de curar ou minimizar o agravamento de uma enfermidade.

A possibilidade de utilização de materiais de arquivo como fornecedores de DNA amplificável por PCR, nas várias frentes da medicina clínica, forense e legal, aumentou a aplicabilidade da técnica, pois permite análises genéticas quando não há disponibilidade de material fresco, e ainda, possibilita a detecção ou mesmo diferenciação de microorganismos patogênicos, sem a necessidade de isolamento em meios de cultivo (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). Além disso, representa uma vasta fonte de material para estudos, construção de bancos de dados para identificação de indivíduos e determinação da constituição genética de uma dada população (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004) em um determinado período de tempo.

Os fixadores de tecido comumente utilizados para análise histológica são baseados em álcool e aldeídos. A fixação de tecidos em soluções alcoólicas, como o etanol e metanol, ocorre por coagulação das proteínas (LYKIDIS et al., 2007). Já os fixadores baseados em aldeídos, como o formaldeído e glutaraldeído, são substâncias eletrofílicas e promovem o entrelaçamento (“crosslink”) entre as proteínas, grupos reativos funcionais das proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas (DAPSON, 2007). Este processo pode causar fragmentação do DNA e comprometer a preservação de macromoléculas (CRISEN; MATTSON, 1993; ISOLA et al., 1994; WESTER et al., 2003; WILLIAMS et al., 2000).

A solução de formol a 10% é o fixador tradicionalmente utilizado em laboratórios de patologia durante várias décadas; apresenta algumas vantagens tais como baixo custo, alta eficiência na preservação da arquitetura do tecido, facilitação no manuseio das peças anatômicas após a fixação, possibilidade de armazenamento por longos períodos, além de conferir ótima qualidade à imagem histológica (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). No entanto, a obtenção de bons resultados na PCR, a partir de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina é notoriamente um processo dificultoso e apresenta desafios a serem vencidos (JOHANSEN et al., 2004; LEWIS et al., 2001). Além disso, os fixadores contendo formol são potenciais substâncias carcinogênicas (INCA, 2012) o que torna necessário a sua utilização sob cuidados especiais. Para o estudo das macromoléculas, normalmente utilizam-se tecidos frescos ou congelados; as substâncias utilizadas para preservação de ácidos nucleicos causam consideráveis danos à arquitetura celular e dificultam a avaliação histopatológica (GILLESPIE et al., 2002). Portanto, nota-se a importância da necessidade de melhorias na preservação dos componentes celulares em tecidos fixados, com o intuito de conferir qualidade molecular, principalmente dos ácidos nucleicos. Estudos têm demonstrado que RNA, DNA e proteínas são bem preservadas em soluções de zinco quando comparadas à soluções compostas por aldeídos, e demonstra ser uma ferramenta importante para manutenção de ácidos nucleicos e macromoléculas para estudos genéticos e proteômicos, pelo fato de não possuírem agentes que causam “cross-link” ou coagulação de proteínas

(BECKSTEAD, 1994; GONZALEZ et al., 2001, JOHANSSON; JANSSON; POWELL, 2000; WESTER et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A partir da confirmação do diagnóstico de paratuberculose bovina em duas propriedades leiteiras na região sul do estado do Rio de Janeiro, uma no município de Rio Claro (Rebanho A) e outra em Barra Mansa (Rebanho B), foi realizado um estudo histopatológico, imuno-histoquímico e por PCR IS900 e F57, no intuito de diagnosticar a infecção antes da manifestação dos sinais clínicos. A infecção nas propriedades estudadas foi confirmada através do histórico, de técnicas anátomo-histopatológicas e imuno-histoquímica, além disso, foi realizado isolamento bacteriano de Map em meio Herrold com gema de ovo e micobactina (LABACVET-UFRGS) a partir de amostras de animais do Rebanho A (YAMASAKI et al., 2010). Os bovinos estudados foram animais descartados do rebanho por variados motivos tais como desordens reprodutivas, fratura em membros, mastite recidivante e não apresentavam sinais clínicos da enfermidade.

3.1. Coleta de fragmentos de tecido

3.1.1 Bovinos sintomáticos

Entre os anos de 2007 e 2011, 4 bovinos que apresentaram os sinais clínicos da enfermidade foram necropsiados nas propriedades; na ocasião, foram coletados fragmentos de diversos órgãos para análise histológica. Também foi realizada citopatologia a partir de material coletado por raspagem de mucosa de diversas regiões do trato intestinal e “imprint” de fragmentos de linfonodos mesentéricos. Após secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por cerca de 5 minutos, e submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen.

Adicionalmente, com o intuito de avaliar a capacidade de manutenção da histomorfologia e dos aspectos moleculares, por dois diferentes fixadores de tecido, foram realizados estudos histopatológico, imuno-histoquímico e por PCR GAPDH, IS900 e F57, de fragmentos de linfonodo mesentérico e de íleo; as secções foram fixadas em solução de zinco e em formol a 10% neutralizado com carbonato de cálcio, na ocasião da necropsia de um bovino (Vaca 383) com sinais clínicos da paratuberculose. As composições das soluções utilizadas neste estudo encontram-se descritas no item 3.2.

3.1.2 Bovinos assintomáticos

No mesmo período, foram realizadas visitas programadas e periódicas ao frigorífico da região para coleta e avaliação macroscópica de diversas secções do intestino delgado, cólon e de linfonodos mesentéricos de 52 bovinos sem manifestação clínica da paratuberculose enviados para abate provenientes de rebanhos positivos para Map. Utilizou-se uma ficha (Anexo 1), em que foram anotados os dados de cada animal, assim como as alterações histológicas observadas em cada porção de intestino e linfonodo mesentérico estudado. Os fragmentos destes animais foram coletados em solução de formol a 10% neutralizado com carbonato de cálcio.

3.2 Soluções fixadoras

3.2.1 Solução de formol a 10% neutralizado

A partir de uma solução estoque de formaldeído a 37% (Pró-químicos, Quimiclor Comercial), foi realizada diluição de 1:10 em água destilada e em seguida neutralizada com carbonato de cálcio.

3.2.2 Solução de zinco

A solução de zinco foi elaborada conforme descrito por Lykidis et al. (2007), denominado Z7 pelos autores. A solução era composta de 0.5% de cloreto de zinco (Vetec), 17,16mM de trifluoroacetato de zinco (Sigma, cat.394017), 0.05% de acetato de cálcio (Sigma, cat. C4705) em 0,1M de Tris(hidroximetil)-aminomethane (Sigma, cat.T-1378), pH 6.4–6.7.

Adicionalmente, foram estabelecidos 3 períodos de tempo em que os fragmentos ficaram imersos na solução fixadora: 24 horas, 2 meses e 16 meses.

3.3 Histopatologia

3.3.1 Bovinos sintomáticos

Fragmentos de tecidos fixados em formol a 10% neutralizado com carbonato de cálcio e em solução de zinco foram processados pelos métodos usuais para análise histológica no Laboratório de Histopatologia, do Projeto Sanidade Animal (PSA), convênio entre Embrapa e UFRRJ. Brevemente, após a fixação foi realizada a desidratação dos fragmentos em banhos de álcool absoluto; a diafanização, em xilol, seguido de banho de parafina a 60°C e por último, incluídas em blocos de parafina. Depois, foram cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina-eosina (HE). Os fragmentos que apresentaram lesões sugestivas de paratuberculose foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (LUNA, 1968) com pequenas modificações, para evidenciação de BAARs, e em seguida avaliados pelo teste imunohistoquímico para *Mycobacterium* spp. e por PCR IS900 e F57. A cada processamento, fragmentos de intestino ou linfonodos mesentéricos oriundos de propriedades positiva e negativa para paratuberculose, foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.3.2 Bovinos assintomáticos

Após a avaliação macroscópica do trato intestinal, fragmentos de duodeno, jejuno, íleo, válvula íleo-cecal, ceco, cólon, reto e linfonodos mesentéricos foram coletados em frascos separados, identificados e fixados em formol a 10% neutralizado com carbonato de cálcio, os quais foram processados pelos métodos usuais para análise histológica, descrito anteriormente.

3.4 Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração foi realizada conforme descrito por Luna (1968); utilizou-se fucsina fenificada comercial (Pró-cito).

3.5 Imuno-histoquímica

As secções foram cortadas em micrótomo a 5µm e aderidas a lâminas de vidro, previamente tratadas com solução de silano (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma-Aldrich, cat.A3648) em acetona a 2% (para proporcionar adesão adequada dos fragmentos). Logo após foram desparafinadas em xilol, em seguida lavadas em álcool e hidratadas em água destilada. A peroxidase endógena tecidual foi inativada com H₂O₂ a 3% em solução aquosa por 30 minutos. Após a lavagem com água destilada, fez-se a reativação antigênica com uso de protease XIV (Sigma, cat.P5147), na concentração de 0,2 mg/ml, por 30 minutos em estufa a 37°C. Novamente foi realizada a lavagem com água destilada, e em seguida as lâminas foram tratadas com leite em pó desnatado (Molico) a 5% em solução aquosa, por 30 minutos, para minimizar as reações inespecíficas do anticorpo e lavadas novamente em água destilada. Depois, as lâminas foram incubadas “overnight” a 6°C (em geladeira) com anticorpo primário contra *Mycobacterium* spp (GeneTex, cat.20905) numa diluição de 1:1000 em PBS (“phosphate buffer saline”) (Anexo 2), para fragmentos ZN positivos e 1:500 para fragmentos ZN negativos. No dia seguinte, após a lavagem das lâminas em água destilada, utilizou-se a técnica do complexo avidina-biotina peroxidase através do kit comercial LSAB (Labeled Streptavidin Biotin, Dako, cat.0690) e a revelação das reações foram realizadas com o cromógeno AEC (Aminoetil-carbamazole, Dako, cat. K3461), de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram contracoloradas com hematoxilina de Harris não alcoólica (LUNA, 1968) com pequenas modificações, e em seguida montadas com lamínula em meio aquoso (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako cod.S3025). A avaliação foi feita em microscópio óptico (Olympus BX41TF), e a gradação da positividade da coloração de ZN e da IHQ foi subjetiva; considerou-se a gravidade e extensão das lesões e também a intensidade da marcação: leve (+), moderada (++) ou acentuada (+++).

3.6 Reação da Polimerase em Cadeia - PCR

O teste PCR foi realizado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ; foi avaliada a capacidade de detecção e amplificação de DNA bovino (GAPDH) e de DNA de Map (IS900 e f57) por PCR convencional, após a fixação dos tecidos em duas diferentes soluções (formol e zinco) e nos diferentes períodos de tempo imersos na solução fixadora, pré-estabelecidos neste estudo.

Antes de iniciar os cortes dos tecidos incluídos em parafina, foi realizada limpeza do micrótomo e adjacências com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 10%, seguido de álcool a 70%, para minimizar as possibilidades de contaminação das amostras. Este procedimento foi adotado criteriosamente para a realização dos cortes entre os diferentes blocos de parafina. Utilizaram-se navalhas descartáveis para microtomia (DuraEdge, EasyPath), as quais foram trocadas a cada novo bloco. Obteve-se 6 secções de 5µm de espessura, as quais foram colocadas em microtubos de 2ml com tampa de rosca (Axygen). Para a remoção da parafina, utilizou-se 1,0 ml de xilol nos microtubos contendo os cortes, por um período de 10 minutos e, após a centrifugação à velocidade de 16.000x g; o xilol foi descartado por inversão do microtubo. Este procedimento foi realizado duas vezes para cada amostra. A seguir, os fragmentos foram lavados em 1ml de álcool absoluto, por três vezes; cada procedimento foi feito num período de 20 minutos; os tubos foram homogeneizados periodicamente e centrifugados antes do descarte do álcool. Para a secagem do álcool residual, os microtubos foram acondicionados sem a tampa, “overnight”, em estantes adequadas. Em seguida, foi realizado o processamento para a extração do DNA.

3.6.1 Extração de DNA

Foram avaliadas duas metodologias para extração de DNA:

3.6.1.1 Método do fenol-clorofórmio álcool-isoamílico

Para o processamento da extração do DNA, colocaram-se 250µL de PBS (Anexo 2) em microtubos contendo os fragmentos de tecido desparafinados. Para a liberação eficiente do DNA das micobactérias utilizaram-se cerca de 50mg de microesferas de vidro (Beads, Sigma, cat.G8772) e colocadas em agitador (Beadsbeater) por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 250 µL de tampão lise composta por SDS 2%, 50mM TrisBase (Sigma, cod. T1503), 200mM EDTA (Invitrogen, cod.15576.028) e 50µL de proteinase K (20mg/mL, Invitrogen, cat.25530015). As amostras foram mantidas a 56°C em banho-maria por cerca de 16 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à velocidade de 16000xg por 10 minutos, o sobrenadante transferido para um novo microtubo e adicionado fenol tamponado, pH 7,6-8,0 (BioAgency) na proporção de 1:1. A mistura foi homogeneizada, centrifugada por 10 minutos à velocidade de 16.000xg e novamente o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, em que foi adicionado fenol-clorofórmio e álcool-isoamílico (24:24:2) na proporção de 1:1 em relação ao volume da amostra. Após homogeneização e centrifugação a 16.000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo; adicionou-se o álcool isopropanol (mesmo volume do sobrenadante) e 30µL de solução de NaCl a 5M em cada amostra, para a precipitação do DNA. Após 1 hora à 4^oC (em geladeira), as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, realizaram-se duas lavagens com 500µL de álcool a 70%, e o álcool residual foi retirado em termobloco a 37°C por 30 minutos. Para finalizar, foram adicionados 50µL de água ultrapura em cada amostra e incubadas “overnight” na geladeira.

3.6.1.2 Método de extração de DNA por kit comercial

Utilizou-se o Kit Zymo MiniPrep (ZymoResearch, cat.D3065). Os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante. Foi utilizado o protocolo para isolamento de DNA com tamanho maior que 500 pares de base.

3.6.2 Espectrofotometria

Após a etapa de extração, a avaliação da qualidade e integridade do DNA, foi realizada a partir dos dados obtidos por espectrofotometria (Nanodrop2000 Spectrophotometer ThermoScientific Uniscience).

3.6.3 Eletroforese do DNA extraído

O DNA extraído de amostras fixadas em zinco e em formol foram analisadas pela eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 0,8%, a 75 Volts por 120 minutos. Baseado nos dados obtidos pela espectrofotometria foi calculada uma quantidade equivalente a 100ng de DNA de cada amostra, e adicionada água livre de DNAase e RNAase e tampão, até o volume final de 15µL. A comparação foi realizada com DNA de fago λ (Fermentas, 300ng/µL) em quantidade equivalente à 50, 100 e 150ng.

3.6.4 PCR GAPDH

Para cada reação utilizaram-se tampão de PCR 1x, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dntp, 10pmol/μL (10μM) de cada “primer”, 0,5U de Taq polimerase (Invitrogen, cod.10966-030) e 1μL de DNA em volume final de 12,5μL. A amplificação foi realizada em tubos de 0,2mL (Labcon) em termociclador (Marca Biometra) de 96 lugares sob as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos (CANNON; DAVIS; PATE, 2008). Os produtos de 854 pares de base para os primers GAPDH, foram avaliados pela eletroforese a 75Volts por 55 minutos em gel de agarose a 1,5% (Sigma, A9539), corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador UV (Biorad). Foram utilizados como controle positivo, DNA extraído de sangue bovino na diluição de 10⁻² e 10⁻³, cuja extração foi realizada com utilização de kit comercial (Qiagen), além disso, utilizou-se água como “template” para a verificação da contaminação entre as amostras avaliadas.

Os iniciadores da PCR GAPDH, foram baseados no estudo de Cannon; Davis; Pate (2007) cuja sequência de nucleotídeos está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência do “primer” GAPDH para amplificação de DNA de bovino e tamanho do “amplicon” da PCR utilizado neste estudo (CANNON; DAVIS; PATE, 2007)

GAPDH	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do produto
Foward	5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCC-3'	854pb
Reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

3.6.4.1 Sensibilidade da PCR GAPDH

Para determinação da sensibilidade da PCR GAPDH, foi utilizado DNA extraído de sangue bovino, por kit comercial (Qiagen); a quantificação foi realizada em espectrofotometro (Nanodrop2000 Spectrophotometer ThermoScientific Uniscience). Em seguida, foram feitas diluições seriadas a 10x, em água livre de DNAase e RNAase e, cada diluição foi utilizada como “template”, desta forma, foi determinada a quantidade mínima de DNA, capaz de ser detectado e amplificado pelo protocolo adotado neste estudo.

As amostras fixadas em formol e em zinco, também foram diluídas a 10⁻¹ e foi determinada a menor diluição capaz de ser detectado pelo protocolo deste estudo.

3.6.5 PCR IS900 e F57

Para cada reação utilizaram-se tampão de PCR 1x, 1,6mM de MgCl₂, 0,2mM de dntp, 10pmol/μL (10μM) de cada “primer”, 0,3U de Taq polimerase (Invitrogen, cod.10966-030) e 1μL de DNA em volume final de 12,5μL. A amplificação foi realizada em tubos de 0,2mL (Labcon) em termociclador (Marca Biometra) de 96 lugares sob as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 68°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e

extensão final a 72°C por 10 minutos (VANSNICK et al., 2004). Os produtos de 452 e 424 pares de base para os primers IS900 e f57, respectivamente, foram avaliados pela eletroforese a 75Volts por 55 minutos em gel de agarose a 1,5% (Sigma, A9539) corado com brometo de etídeo, e visualizados em transluminador UV (Biorad). Foram utilizados como controle positivo, DNA extraído de Map, isolado em HEYM no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Labacvet-UFRGS) na diluição de 10⁻⁵ e 10⁻⁶ e, como controle negativo intestino e linfonodo mesentérico fixados em formol e incluídos em parafina, de bovino oriundo de rebanho livre de paratuberculose; além disso, utilizou-se água como “template” para a verificação da contaminação entre as amostras avaliadas.

Os iniciadores da PCR IS900 e F57 utilizados neste estudo, foram baseados no estudo de Vansnick et al. (2004), os quais, segundo os autores, foram desenvolvidos de acordo com a sequência de inserção IS900 e f57 (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência, posição e tamanho do “amplicon” dos “primers” de Map utilizados neste estudo (VANSNICK et al., 2004)

Primers PCR	Sequência de nucleotídeos	Gene alvo	Posições de anelamento	Tamanho do produto
IS900 S2	5'-GGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGT-3'	IS900	228-251	452
IS900 R1	5'-CGATCAGCCACCAGATCGGAA- 3'		657-677	
F57	5'-CCTGTCAATTCGATCACGGACTAGA-3'	F57	151-176	424
F57Rn	5'-TGGTGTACCGAATGTTGTTGTCAC- 3'		549-572	

3.6.5.1 Sensibilidade da PCR IS900 e F57

Para determinação da sensibilidade do teste PCR IS900 e F57, foi utilizado DNA de Map isolado em HEYM, cedido pelo Labacvet-UFRGS, extraído pelo método fenol-clorofórmio; a quantificação foi realizada em espectrofômetro (Nanodrop2000 Spectrophotometer ThermoScientific Uniscience). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas a 10x, em água livre de DNAase e RNAase e, cada diluição foi utilizada como “template” para a PCR IS900 e F57; desta forma, determinou-se a quantidade mínima de DNA, capaz de ser detectado e amplificado pelo protocolo adotado neste estudo.

As amostras fixadas em formol e em zinco, também foram diluídas a 10⁻¹ e foi determinada a menor diluição capaz de ser detectado pelo protocolo utilizado neste estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Bovinos do estudo

Entre os anos de 2007 e 2011, foram avaliadas vacas leiteiras de dois rebanhos positivos para paratuberculose na região sul do estado do Rio de Janeiro. No total foram analisados 56 bovinos oriundos de dois rebanhos:

1. Do Rebanho A, localizado no município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro, foram estudadas 52 vacas da raça Girolanda oriundas do município de Resende, estado do Rio de Janeiro. Destas, dois bovinos (Vaca 267 e Vaca 383) apresentaram sinais clínicos típicos da doença de Johne tais como emagrecimento, diarreia intermitente e profusa, as quais foram necropsiadas na propriedade. Outros 50 animais eram assintomáticos e foram enviados para abate por variados motivos, tais como mastite recidivante, problemas nos cascos, ausência de cio e ou fratura em membros, o que inviabilizaria a manutenção destes animais no rebanho; todos foram abatidos no frigorífico local.
2. Do Rebanho B, localizado no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, foram avaliados quatro bovinos; destes, dois eram sintomáticos e dois assintomáticos, e todos foram necropsiados.

4.2 Sinais clínicos e macroscopia

4.2.1 Bovinos sintomáticos

Os quatro bovinos com paratuberculose clínica (duas vacas do Rebanho A e duas do Rebanho B) apresentaram magreza (Figura 1), pelagem com aspecto eriçado e opaco, e episódios de diarreia, eliminada sob forma de jato. À necropsia, foram observados vasos linfáticos do mesentério e da serosa intestinal proeminentes, esbranquiçados e com aspecto varicoso (Figuras 2 e 3); serosa do intestino delgado principalmente no íleo, com aspecto anelado e/ou cerebroide de grau moderado a acentuado, mucosa intestinal com acentuado pregueamento e rugosidade, com microgranulações em sua superfície. Havia aumento de volume dos linfonodos mesentéricos, que protraía ao corte e apresentava nódulos esbranquiçados de variados tamanhos, distribuídos por todo o parênquima.



Figura 1. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vaca 383, magra com paratuberculose clínica do Rebanho A, localizado no município de Rio Claro, RJ.

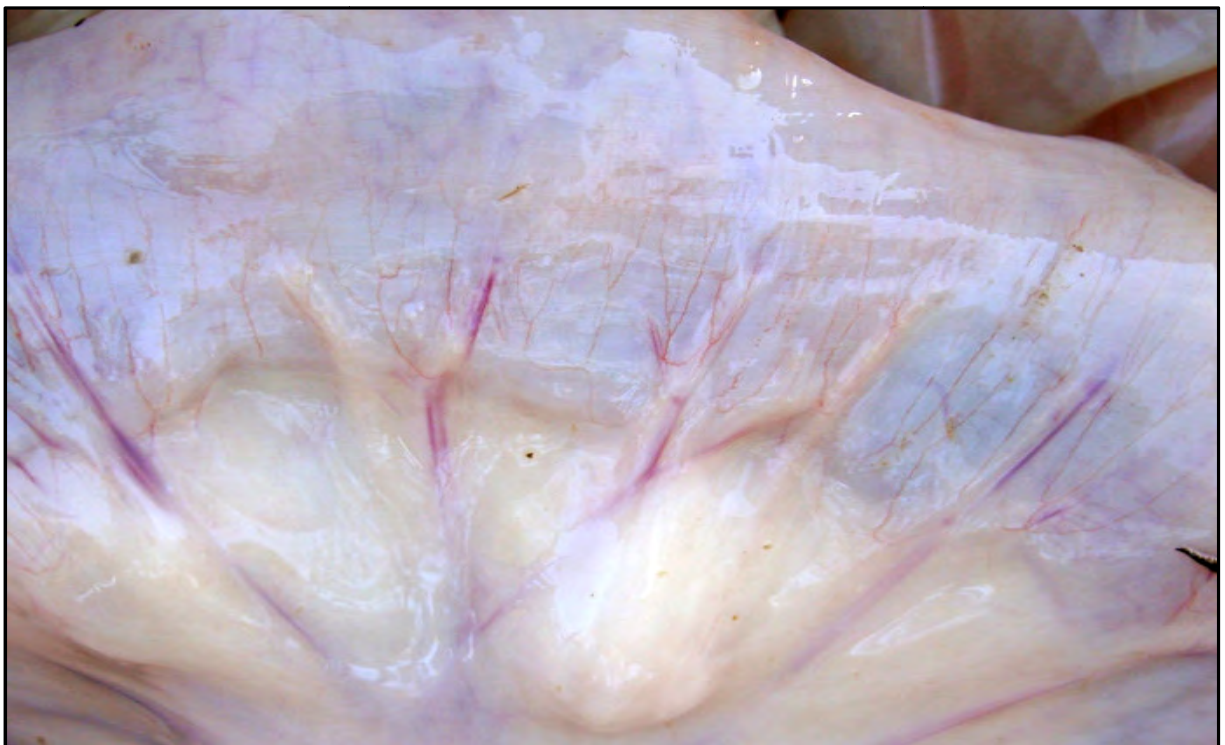


Figura 2. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vasos linfáticos mesentéricos e subserosos do intestino delgado, proeminentes e esbranquiçados de vaca com paratuberculose clínica (Vaca 383), do Rebanho A localizado no município de Rio Claro, RJ.



Figura 3. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vaso linfático proeminente e com aspecto tortuoso em serosa de intestino delgado da Vaca 276 com paratuberculose clínica, do Rebanho A localizado no município de Rio Claro, RJ.

Na ocasião da necropsia de vacas com paratuberculose clínica do rebanho A, foram realizadas raspagens da mucosa do íleo para confecção de esfregaços, que quando submetidas à coloração de ZN visualizaram-se inúmeros aglomerados de BAAR (Figura 4).

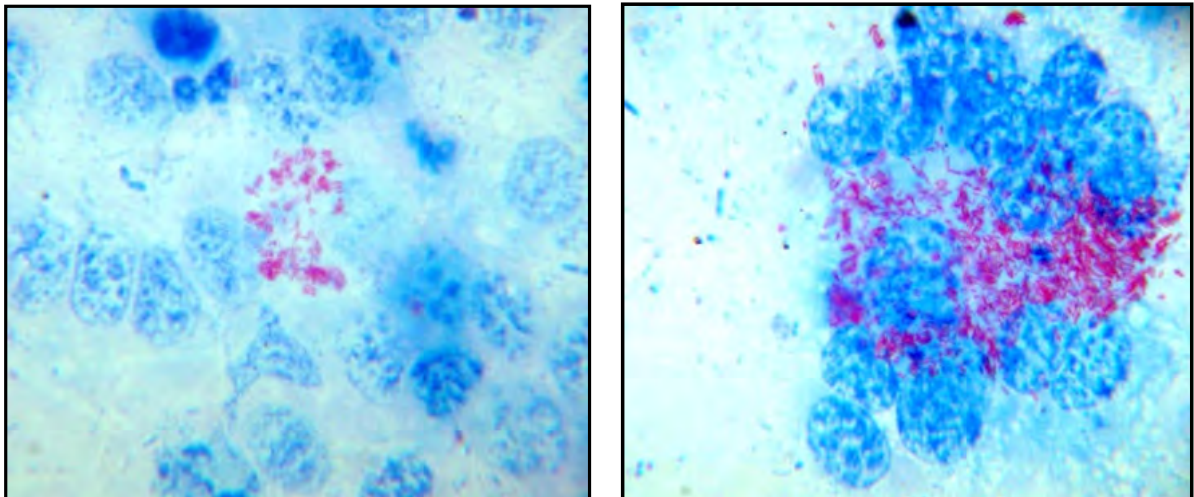


Figura 4. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Citologia de raspado de mucosa do íleo, de vaca do Rebanho A com paratuberculose clínica (Vaca 276), localizado no município de Rio Claro, RJ. A coloração de Ziehl-Neelsen revelou aglomerados de bacilos álcool-ácido resistentes.

4.2.2 Bovinos assintomáticos

A macroscopia de várias porções do intestino delgado e grosso das vacas assintomáticas provenientes de rebanho paratuberculose-positivo, demonstrou áreas avermelhadas na mucosa (Figura 5A e B), de intensidade leve a moderada; no intestino delgado de alguns bovinos havia áreas elevadas (Figura 6) e as placas de Peyer estavam proeminentes (Figura 7). Os linfonodos mesentéricos de alguns bovinos apresentaram aumento de volume em graus leve a moderado e evidenciação de vasos linfáticos (Figura 8). As principais alterações macroscópicas observadas no intestino delgado e linfonodos mesentéricos dos bovinos do rebanho A estão listadas na tabela 4.



Figura 5A. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa avermelhada do íleo de vaca assintomática proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 518, SAP 31067.



Figura 5B. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa intestinal avermelhada de vaca assintomática proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Abate realizado em 2007.



Figura 6. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa de duodeno com elevações e projeções de bovino assintomático (Vaca 485) do Rebanho A, positivo para paratuberculose.



Figura 7. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Placa de Peyer proeminente em jejuno de bovino assintomático (Vaca 202) do Rebanho A, positivo para paratuberculose.



Figura 8. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vasos linfáticos intestinais mesentéricos e subserosos evidentes de bovino assintomático proveniente do Rebanho A, positivo para paratuberculose, no município de Rio Claro, RJ. Abate realizado em 2007.

Tabela 4. Macroscopia do intestino delgado e linfonodos mesentéricos de vacas assintomáticas abatidas do Rebanho A, positivo para paratuberculose, localizado no município de Rio Claro, RJ (Continua)

Data do abate/coleta	No. do registro no SAP	Identificação	Idade ao abate (anos)	Mucosa intestinal com áreas avermelhadas			Vasos linfáticos evidentes	Linfonodos Mesentéricos	OBS
				Duodeno	Jejuno	Íleo		Aumentados, úmidos ao corte com áreas claras	
07/05/07	30918-923	490	9	-	+	+	-	-	-
	30924-929	516	7	-	-	-	-	-	-
	30930-935	529	-	+	+	-	-	-	-
	30936-941	505	7	++	+	-	-	-	-
	30942-947	549	4	++	-	+	-	-	-
	30948-953	486	8,5	+	-	+	-	-	-
	30954-959	575	14	-	-	+	-	-	-
	30960-965	524	7	+	++	-	-	+(+)	-
	30966-970	552	4	-	++	+	-	(+)	-
	30971-975	310	3	-	++	-	-	-	-
	30976-979	482	9	+	-	-	-	(+)	Duodeno com elevações e projeções na mucosa +
	30980-983	574	13	-	-	+	-	-	-
	30984-987	562	4	+	+	+	-	(+)	Duodeno com elevações e projeções na mucosa +
	30988-991	495	7	+	-	-	-	-	Duodeno com elevações e projeções na mucosa +
	30992-995	283	3,5	-	+	-	-	-	-
30996-31001	470	-	-	+	-	+	-	Duodeno com elevações e projeções na mucosa +	
29/08/07	31047-052	278	4	-	-	-	-	-	-
	31053-058	541	5	-	-	-	-	-	-
	31059-064	487	-	-	-	-	-	-	-
	31065-070	518	7	+	-	+	-	+	-
	31071-076	483	10	+	-	-	-	-	-
	31077-082	537	-	+	-	++	-	-	-
	31083-088	448	-	-	+	++	++	-	-

Tabela 4. Continuação

23/01/08	31157-162	172	6	-	-	-	+	-	-
	31163-168	480	10	+	-	-	-	-	Placas de Peyer saliente
	31169-174	546	6	-	-	-	+	+ líquido esbranquiçado ao corte	Duodeno com elevações e projeções na mucosa +
	31175-180	481	3	-	-	-	+	-	-
	31187-192	398	-	+	-	++	+	-	Duodeno e íleo com elevações e projeções na mucosa +
	31181-186	202	5,5	+	-	++	+	-	Duodeno e íleo com elevações e projeções na mucosa +
20/05/08	31401-406	530	6	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31407-412	511	7	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31413-418	155	-	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31419-424	523	6	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31425-430	289	3,5	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31431-436	496	-	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31437-442	519	7	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
	31443-448	437	-	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	-
07/07/08	31510-515	532	5	-	-	-	-	-	-
	31516-521	489	9	-	-	-	+	-	-
	31522-527	536	-	+	-	-	-	-	-
	31528-533	219	6	-	-	-	-	-	-
	31534-539	503	7	-	-	-	-	-	-
	31540-545	485	8	+	-	-	-	+	-
	31546-551	491	8	-	-	-	++	-	-
	31552-557	520	7	+	-	-	-	-	-
21/7/2008	31574-579	84	-	-	-	-	-	-	-
	31580-585	85	-	-	-	-	-	-	-
15/10/2008	31620-626	476	14	-	-	-	-	-	
16/06/2009	31843	248	-	-	-	-	-	-	
24/01/2009	31720-724	533	6	-	-	-	-	-	Aspecto levemente espessado do íleo

SAP, Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ; -, sem alterações; n/e, não examinado; grau das lesões: + leve, ++ moderado, +++ acentuado

4.3 Histopatologia

4.3.1 Animais sintomáticos e assintomáticos

As lesões histológicas foram classificadas de acordo com a descrição de Clarke (1997), em que foi considerada a intensidade da infiltração granulomatosa no intestino e nos linfonodos mesentéricos.

4.3.1.1 Bovinos sintomáticos

Rebanho A. As duas vacas sintomáticas (Vacas 276 e 383) apresentaram lesões acentuadas principalmente em jejuno, íleo e linfonodos mesentéricos. Observaram-se grande quantidade de células gigantes na mucosa principalmente em jejuno e íleo, presença de debris celulares na luz das glândulas intestinais; submucosa espessada devido à presença de macrófagos epitelioides com eventual formação de células gigantes, inclusive na luz de vasos linfáticos, que em alguns casos apresentavam linfangite granulomatosa além de plexos nervosos de Meissner envoltos pela inflamação, assim como grande quantidade de BAAR em mucosa e em menor intensidade na submucosa de jejuno e íleo, e em outras secções do trato intestinal. Os linfonodos mesentéricos, igualmente apresentavam acentuada infiltração macrofágica com formação de células gigantes de Langhans e presença de BAARs. Os animais desta categoria apresentavam sinais clínicos típicos da doença de Johnne.

Rebanho B. Neste rebanho, os dois bovinos com sinais clínicos da enfermidade apresentaram lesões de graus moderado a acentuado, compatíveis com paratuberculose, semelhantes àqueles observadas nos animais do Rebanho A. Destes animais foram analisadas secções do intestino delgado e linfonodos mesentéricos. Inúmeros agregados de BAARs foram visualizados.

4.3.1.2 Bovinos assintomáticos

Rebanho A. Dos 50 animais provenientes do rebanho A, 31 vacas (62%) apresentaram inflamação granulomatosa no jejuno (Figuras 9, 10, 13A e B), íleo (Figuras 11 e 12) e ou nos linfonodos mesentéricos (Figura 14); a intensidade das lesões era de leve a moderada (Tabela 5). As lesões leves apresentaram poucos agregados de macrófagos (epitelioides) e ou células gigantes de Langhans em regiões pontuais da mucosa de jejuno, íleo e ou linfonodos mesentéricos. Já as lesões moderadas consistiram em presença de macrófagos epitelioides com formação de células gigantes e considerável espessamento da lâmina própria, e infiltração granulomatosa focal na submucosa, assim como na luz de vasos linfáticos desta camada; BAARs não foram observados, no entanto, em alguns casos, no aumento de 1000x, poderia se suspeitar da presença dos bacilos à coloração de ZN, não evidenciados nitidamente nesta coloração e que, ao teste de IHQ, apresentaram marcação positiva.

Em 19 vacas (38%) não foram observadas alterações histológicas compatíveis com a infecção (Tabela 4). A idade dos bovinos que apresentaram lesões granulomatosas no intestino delgado (jejuno e íleo) variou de 4 a 10 anos (Tabelas 4 e 5). Não foram observadas lesões no intestino grosso compatíveis com paratuberculose em todos os animais abatidos. As

alterações observadas à histopatologia de várias porções do intestino delgado e de linfonodos mesentéricos dos bovinos do Rebanho A, estão listadas na Tabela 5.

Rebanho B. Dos dois animais assintomáticos do rebanho B, apenas um bovino apresentou leve a moderada infiltração por macrófagos epitelioides na mucosa e submucosa do intestino delgado e linfonodo mesentérico (Figura 15), sugestivas de paratuberculose.

Tabela 5. Histopatologia do intestino delgado e linfonodos mesentéricos das vacas assintomáticas abatidas do rebanho A, positivo para paratuberculose, localizada no município de Rio Claro, RJ (Continua)

Data do abate/ coleta	No. de registro no SAP	Identificação	Idade ao abate (anos)	Duodeno		Jejuno		Íleo		Linfonodos mesentéricos	Coloração de Ziehl-Neelsen	IHQ <i>Mycobacterium</i> spp
				Mucosa	Submucosa	Mucosa	Submucosa	Mucosa	Submucosa			
07/05/07	30918-923	490	9	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	30924-929	516	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30930-935	529	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30936-941	505	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30942-947	549	4	-	-	ME, CG +	ME, CG +	-	-	ME, CG+	-	Íleo+ LM+
	30948-953	486	8,5	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	30954-959	575	14	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	30960-965	524	7	-	-	CG+	-	-	-	ME,CG+	-	LM ++
	30966-970	552	4	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	30971-975	310	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30976-979	482	9	-	-	-	-	ME+	-	ME++	-	neg
	30980-983	574	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30984-987	562	4	-	-	ME, CG+	-	ME, CG+	-	ME+	-	Jej +
	30988-991	495	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30992-995	283	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30996-31001	470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29/08/07	31047-052	278	4	-	-	-	-	-	-	ME++	-	neg
	31053-058	541	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31059-064	487	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31065-070	518	7	-	-	ME, CG+	ME, CG+	ME, CG+	ME, CG+	ME+	-	íleo+
	31071-076	483	10	-	-	ME, CG+	-	-	-	ME+	-	Jej +
	31077-082	537	-	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31083-088	448	-	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
23/01/08	31157-162	172	6	-	-	-	-	CG +	-	ME+	-	neg
	31163-168	480	10	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31169-174	546	6	-	-	ME+	-	ME+	-	-	-	-
	31175-180	481	3	-	-	-	-	ME+	-	-	-	-
	31187-192	398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31181-186	202	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5. Continuação

20/05/08	31401-406	530	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	31407-412	511	7	-	-	-	ME+	ME+	ME+	-	neg
	31413-418	155	-	-	-	-	-	-	-	-	neg
	31419-424	523	6	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31425-430	289	3,5	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31431-436	496	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31437-442	519	7	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
31443-448	437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
07/07/08	31510-515	532	5	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31516-521	489	9	-	-	-	ME+	ME+	ME+	-	neg
	31522-527	536	-	-	-	-	-	ME+	ME+	-	neg
	31528-533	219	6	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
	31534-539	503	7	-	-	-	ME+	-	ME+	-	neg
	31540-545	485	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	31546-551	491	8	-	-	-	-	-	-	-	-
31552-557	520	7	-	-	-	-	-	-	-	-	
21/7/2008	31574-579	84	-	-	-	-	ME+	ME+	-	-	neg
	31580-585	85	-	-	-	-	-	-	ME+	-	neg
15/10/08	31620-626	476	14	-	-	-	-	ME+	ME+	-	neg
16/06/09	31843	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24/01/09	31720-724	533	6	-	ME+	ME+	ME+ CG+	ME+ CG+	ME+ CG+	-	Íleo+

SAP: Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ; - sem alterações; grau das lesões observadas na histopatologia: + leve, ++ moderado, +++ acentuado; ME: macrófagos epitelioides; CG: células gigantes de Langhans; LM: linfonodo mesentérico; neg: resultado negativo

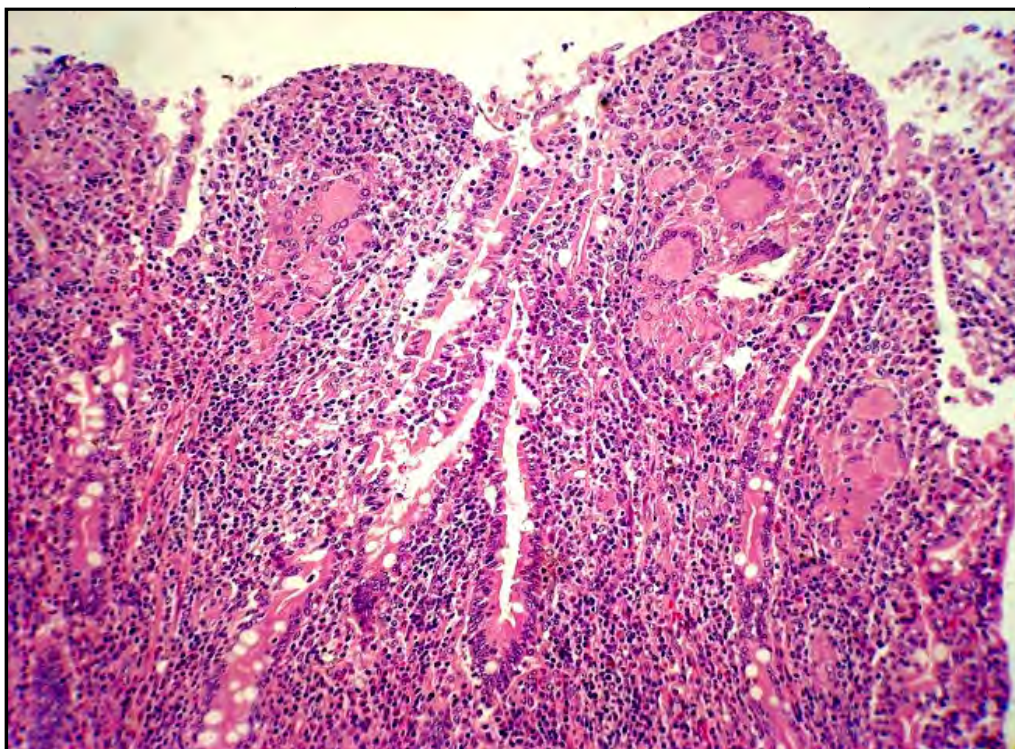


Figura 9. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa de jejuno com moderada infiltração granulomatosa e formação de células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 562, SAP 30985, HE, obj.4x.

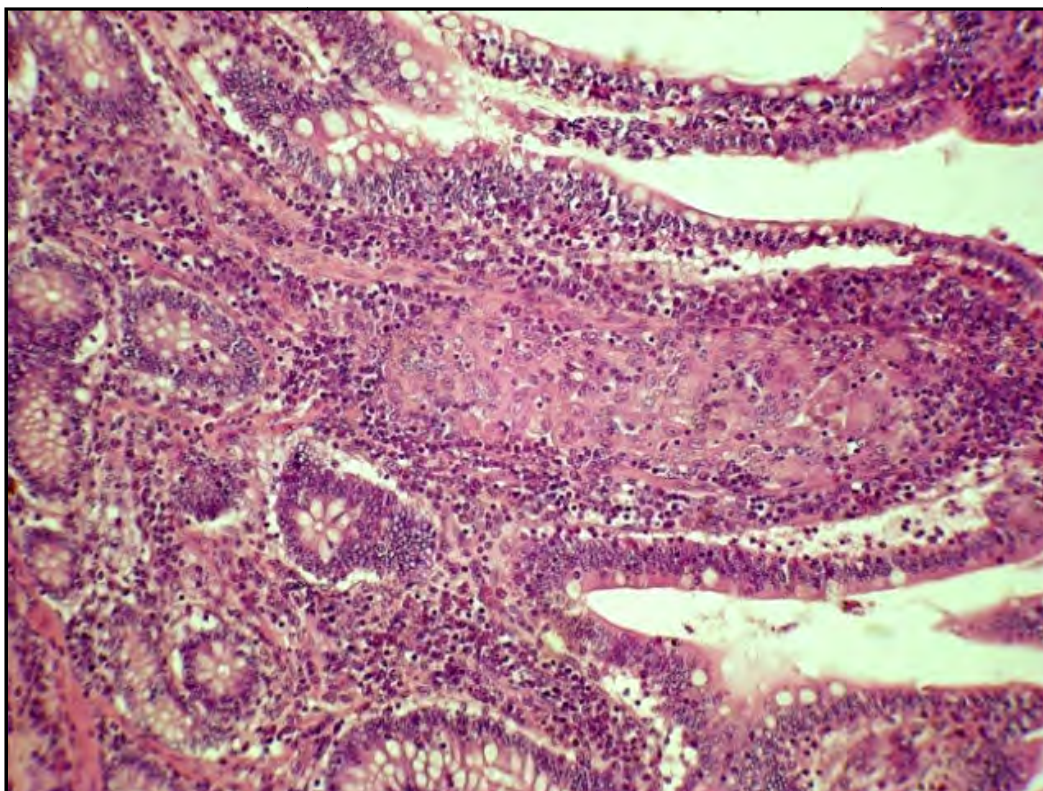


Figura 10. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Vilosidade de mucosa do jejuno espessada devido à moderada infiltração por macrófagos epitelioides e células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 483, SAP 31072, HE, obj.16x.

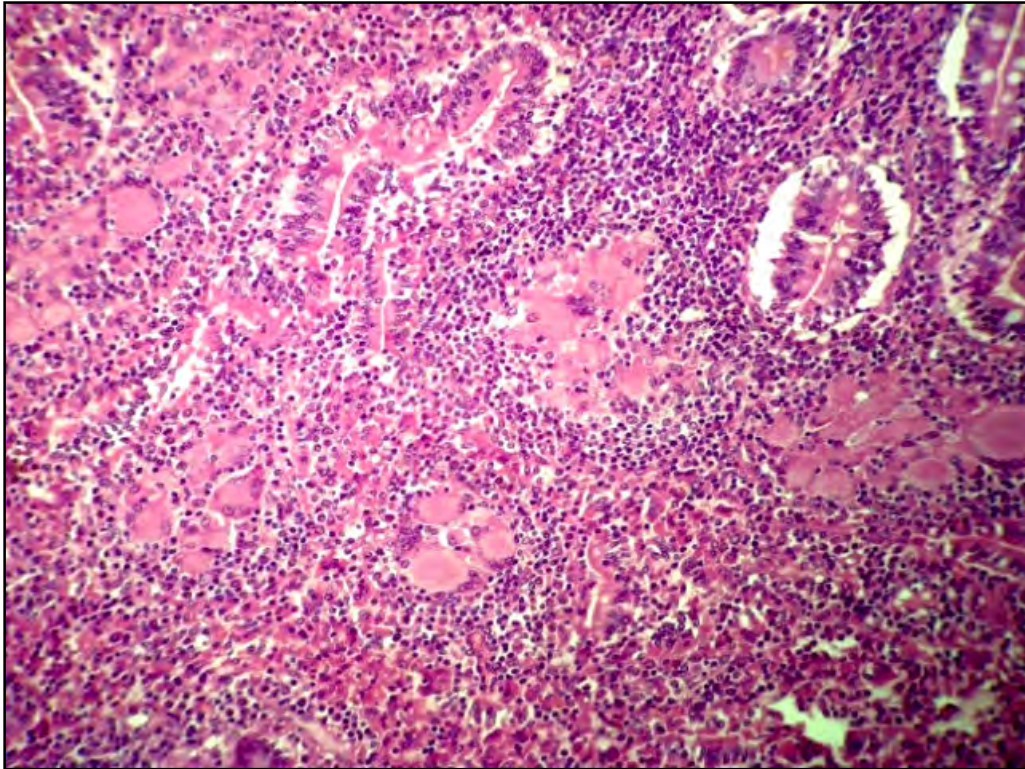


Figura 11. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Mucosa do íleo com moderada infiltração mononuclear e presença de células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 518, SAP 31067, HE. Obj.10x.

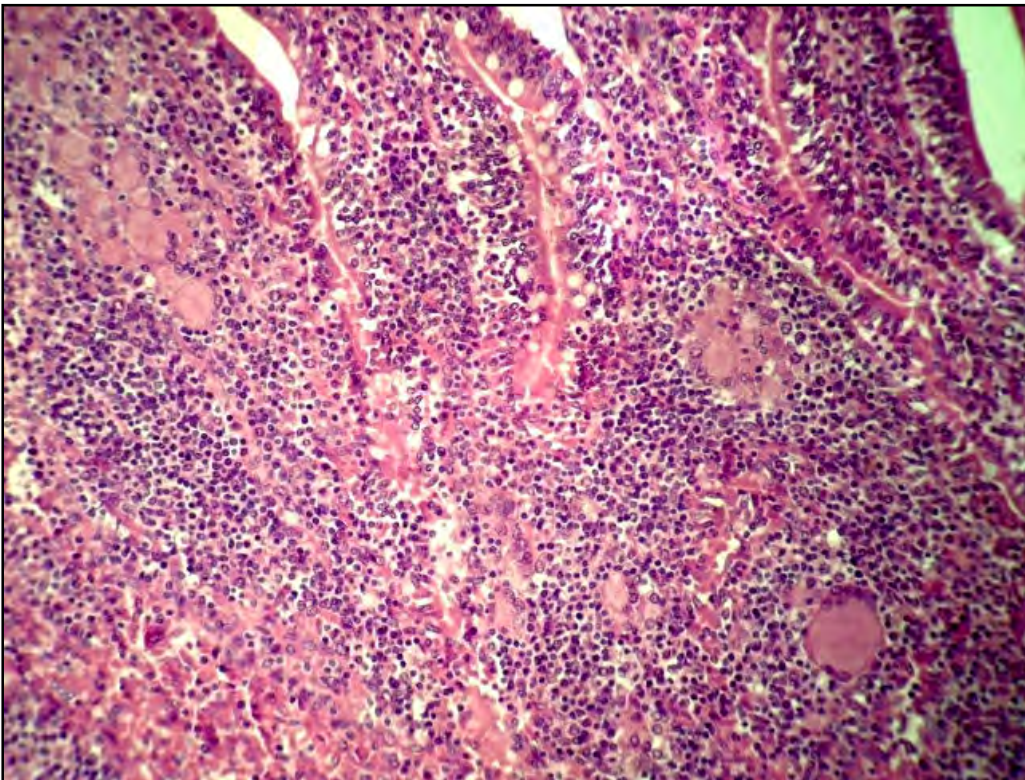


Figura 12. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Espessamento da lâmina própria da mucosa do íleo decorrente da infiltração mononuclear e de células gigantes de Langhans de vaca assintomática de Rebanho A positivo para paratuberculose Vaca 518, SAP 31067, HE, obj.10x.

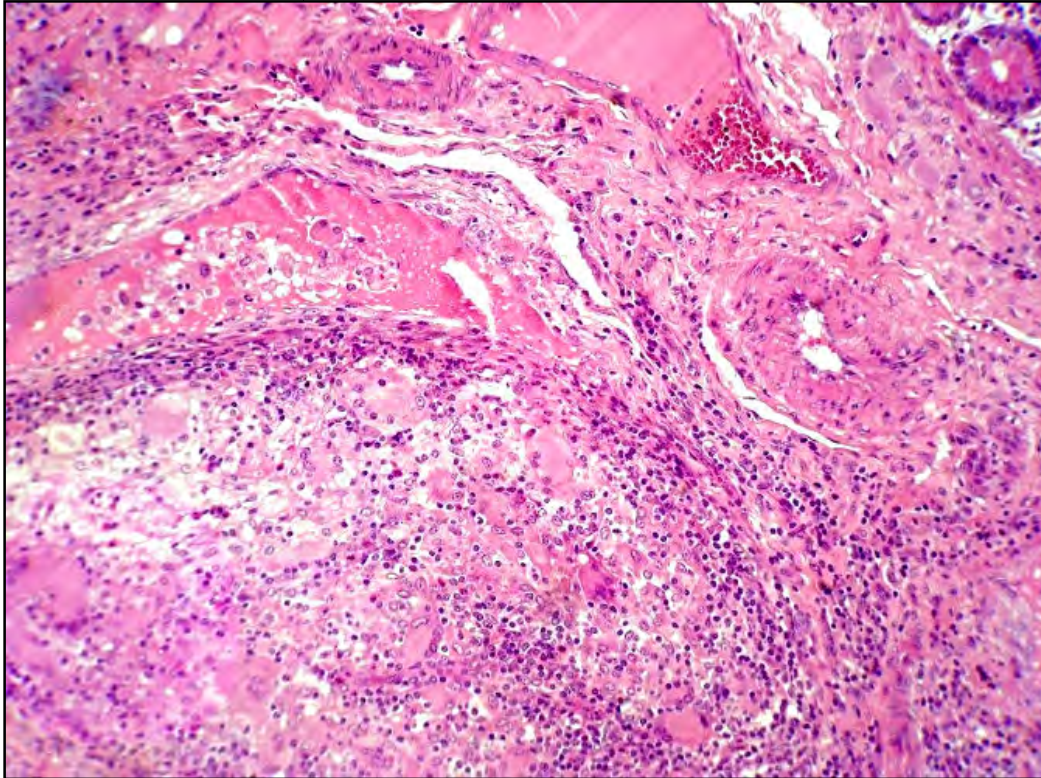


Figura 13A. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Submucosa de jejuno com inúmeras células gigantes de Langhans e macrófagos com citoplasma vacuolizado na luz de vaso linfático de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 549, SAP 30943, HE, obj.16x.

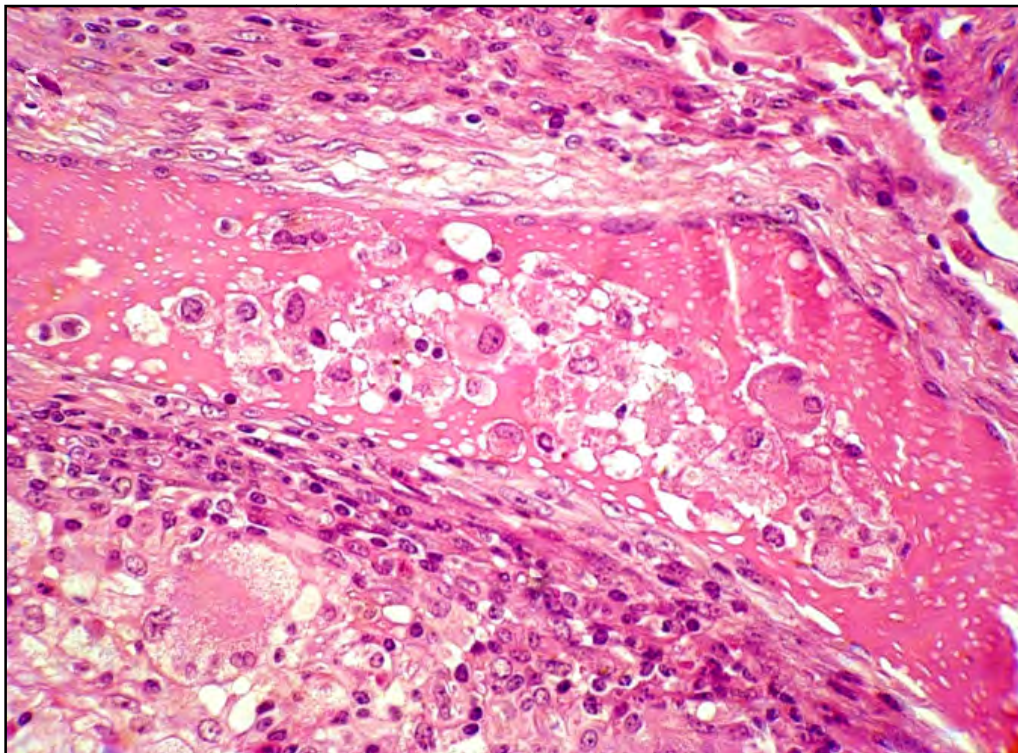


Figura 13B. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Detalhe da figura anterior. Luz de vaso linfático com inúmeros macrófagos com citoplasma vacuolizado. Vaca 549, SAP 30943, HE, obj.40x.

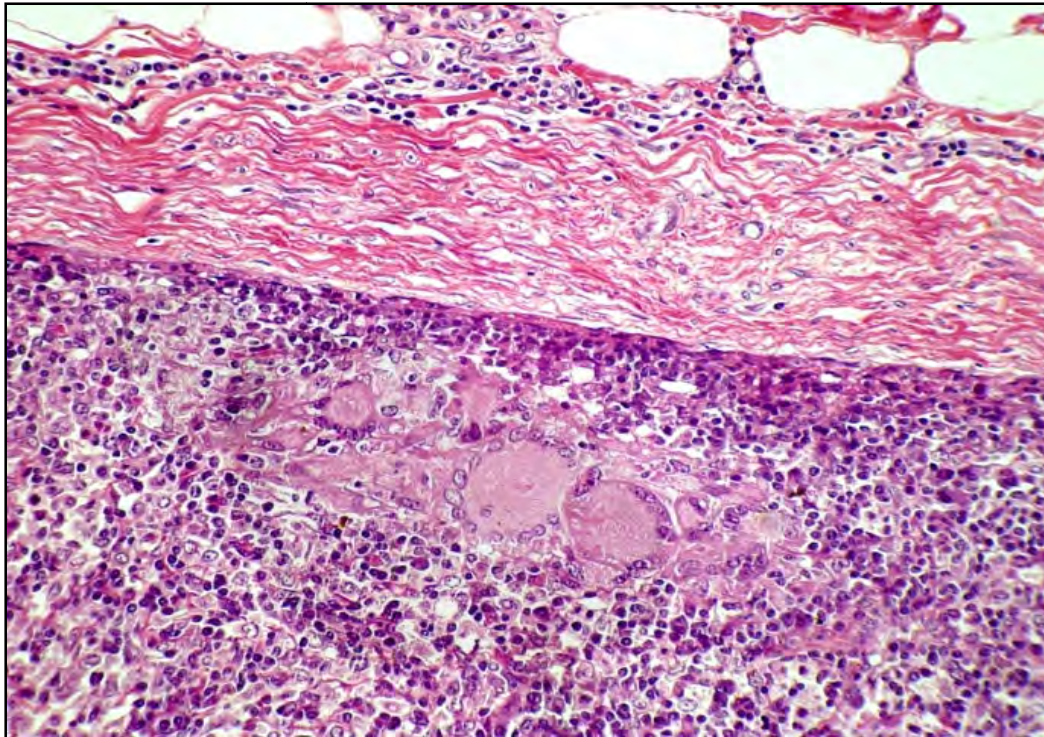


Figura 14. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Seio subcapsular de linfonodo mesentérico com inflamação granulomatosa rica em células gigantes de Langhans de vaca assintomática do Rebanho A positivo para paratuberculose Vaca 524, SAP 30965, HE, obj.16x.

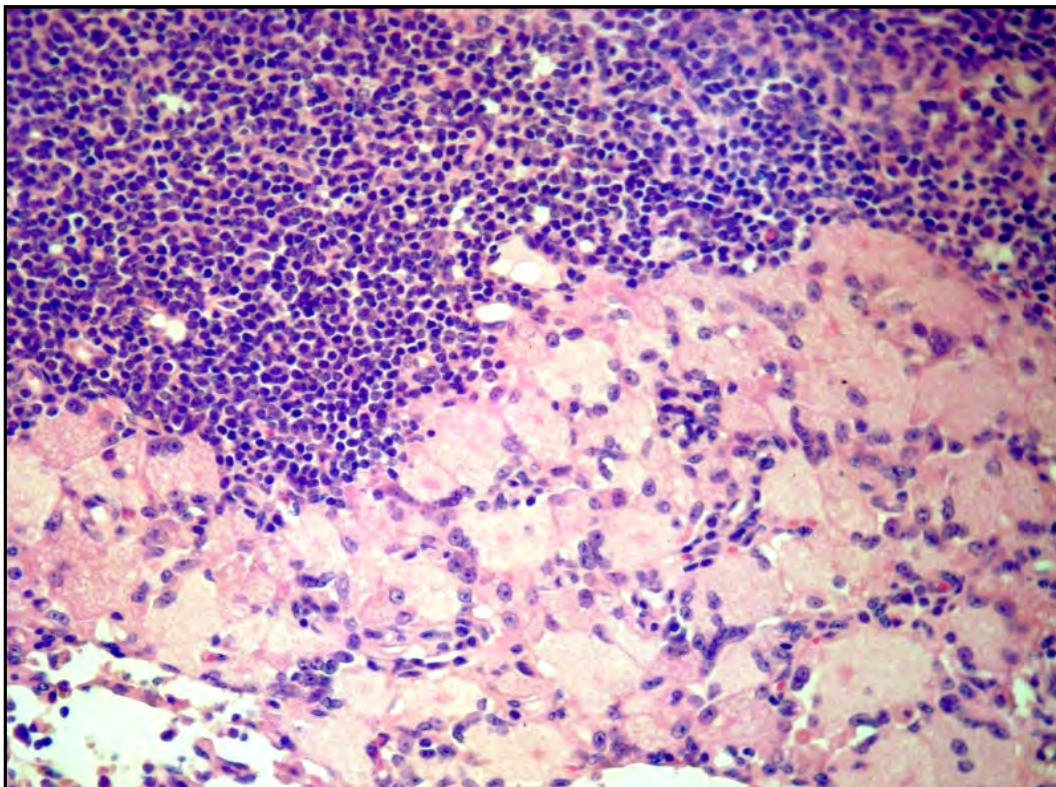


Figura 15. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com inúmeras células gigantes de Langhans em linfonodo mesentérico de bovino do Rebanho B, positivo para paratuberculose. SAP 31628, obj.20x.

4.3.2 Estudo dos fixadores / Manutenção da arquitetura histológica

4.3.2.1 Tecidos fixados em solução de zinco

Foram observadas diferenças histomorfológicas dos fragmentos fixados em zinco em relação aos fixados em formol e entre os diferentes períodos de tempo imersos na solução.

Notou-se encolhimento das células, em graus leve a moderado e maior afinidade tintorial, principalmente à hematoxilina, tanto nas secções de íleo quanto nos linfonodos mesentéricos fixados em zinco (Figuras 16 e 17).

Fragmentos fixados em zinco por 2 e 16 meses demonstraram, respectivamente, leve e moderada perda do contorno celular, conferindo aparência de autólise, principalmente, no ápice das vilosidades; no entanto, não houve dificuldade na identificação das células e das estruturas histológicas (Figuras 16 e 17).

4.3.2.2 Tecidos fixados em solução de formol a 10%

A imagem histológica dos fragmentos fixados em formol a 10% foram similares nos diferentes períodos de tempo analisados (24 horas, 2 meses e 16 meses). Não foram observadas alterações histomorfológicas nas secções avaliadas (Figuras 16 e 17).

SOLUÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%

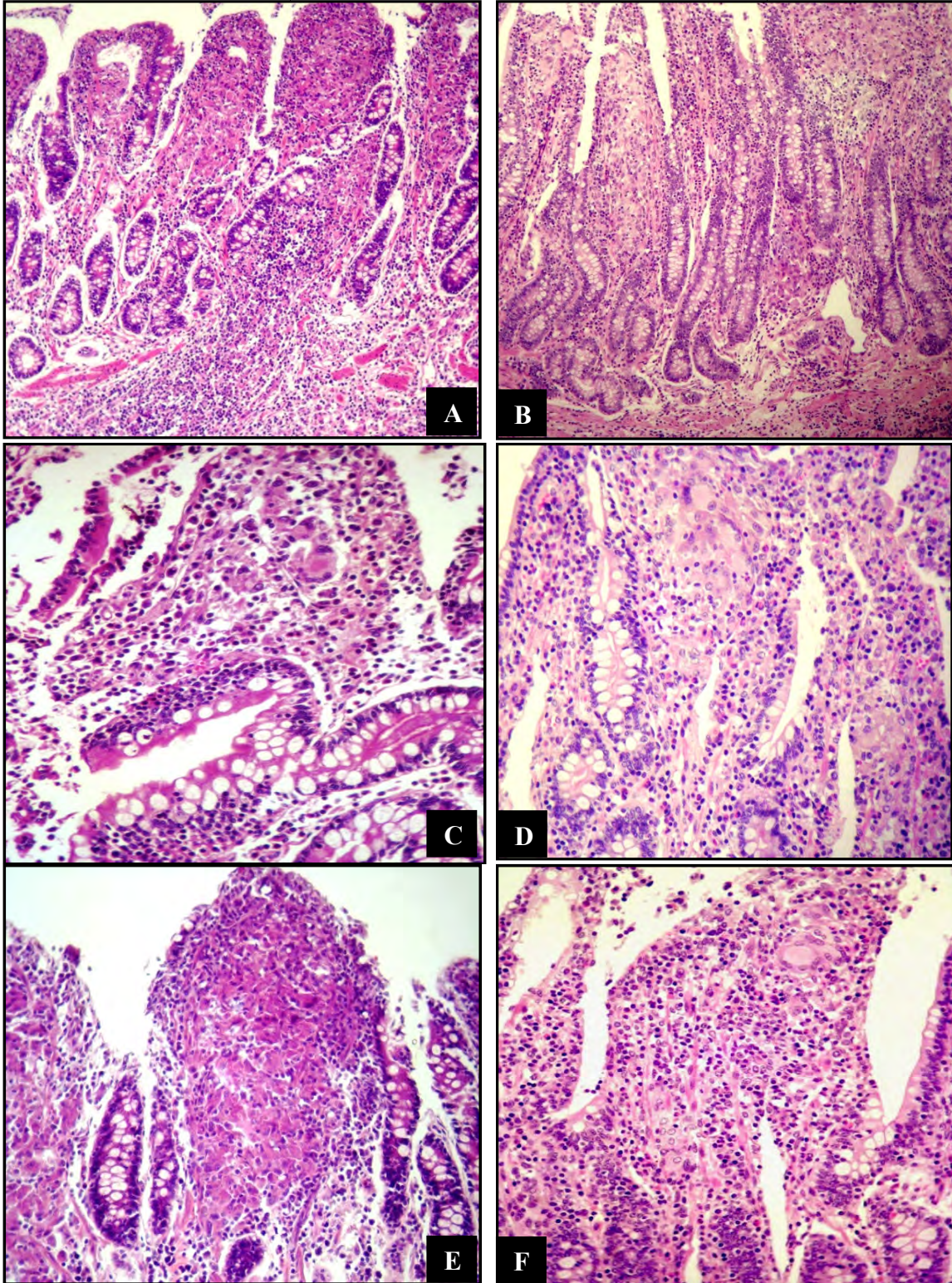


Figura 16. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A fixação por solução de zinco conferiu manutenção da estrutura histológica similar ao observado pela fixação por formol, no entanto, apresentou encolhimento das células, em graus leve a moderado. Íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixado em solução de zinco e de formol em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Hematoxilina-eosina.

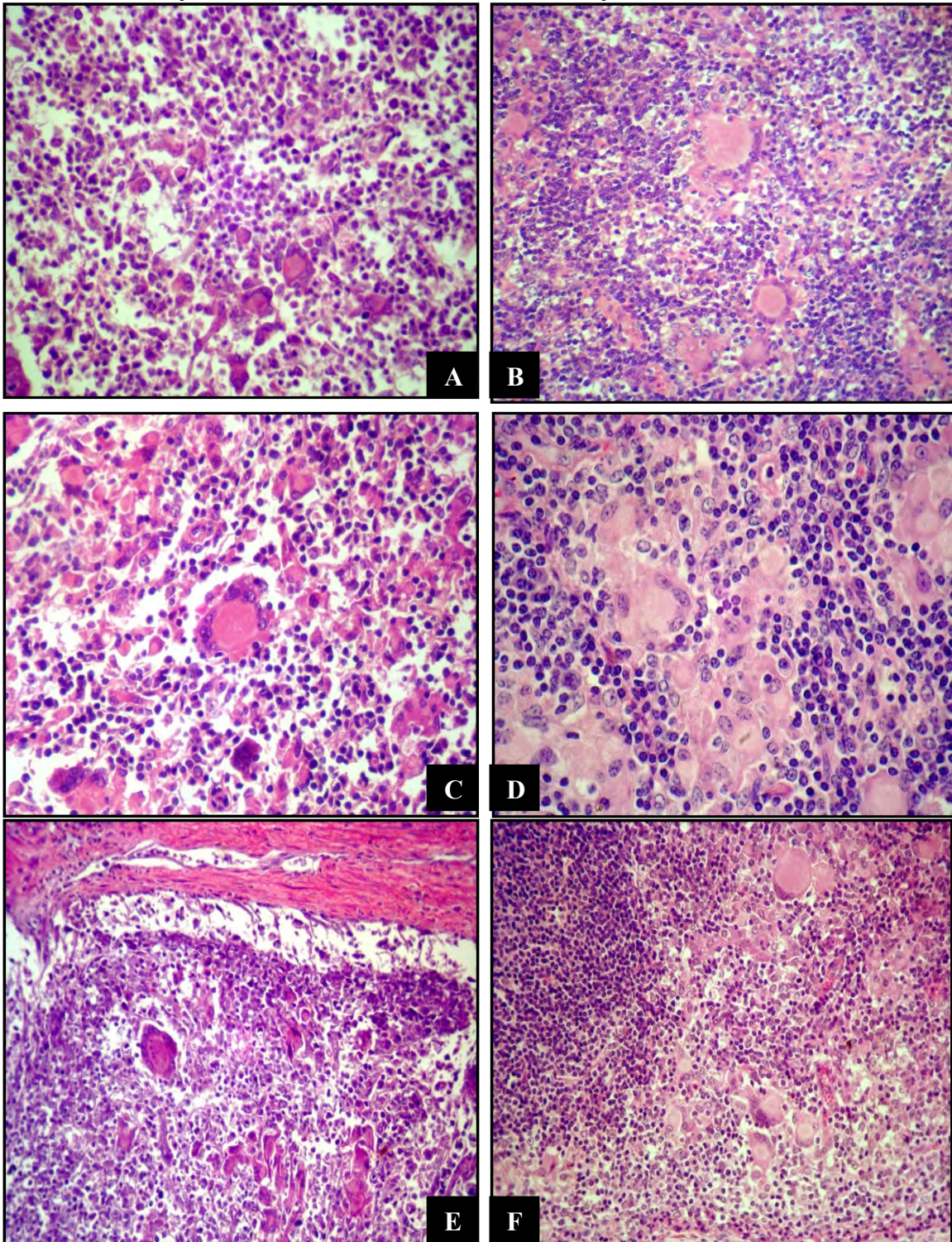
SOLUÇÃO DE ZINCO**SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%**

Figura 17. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Encolhimento das células, em graus leve a moderado, foi observado em tecidos fixados pela solução de zinco. Linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Hematoxilina-eosina.

4.4 Coloração de Ziehl-Neelsen

4.4.1 Animais sintomáticos e assintomáticos

4.4.1.1 Vacas sintomáticas

Os animais com sinais clínicos da paratuberculose do Rebanho A e do Rebanho B apresentaram inúmeros aglomerados de BAARs em intensidade moderado a acentuado em intestino e linfonodo mesentérico.

4.4.1.2 Vacas assintomáticas

A coloração de ZN, não revelou presença de BAAR em nenhum dos fragmentos analisados, dos animais de ambos os rebanhos. No entanto, no teste de IHQ, seis bovinos do rebanho A apresentaram marcação positiva para *Mycobacterium* spp.

4.4.2 Estudo dos fixadores

A coloração de Ziehl-Neelsen evidenciou BAARs, no três diferentes períodos de tempo nas soluções fixadoras estabelecidos neste estudo (24 horas, 2 meses e 16 meses), não foram evidenciadas variações dignas de nota nas diferentes amostras (Figuras 18 e 19). Da mesma forma, a afinidade à fucsina e a intensidade da coloração foram semelhantes nos fragmentos fixados tanto na solução de zinco quanto em formol (Figuras 18 e 19).

SOLUÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%

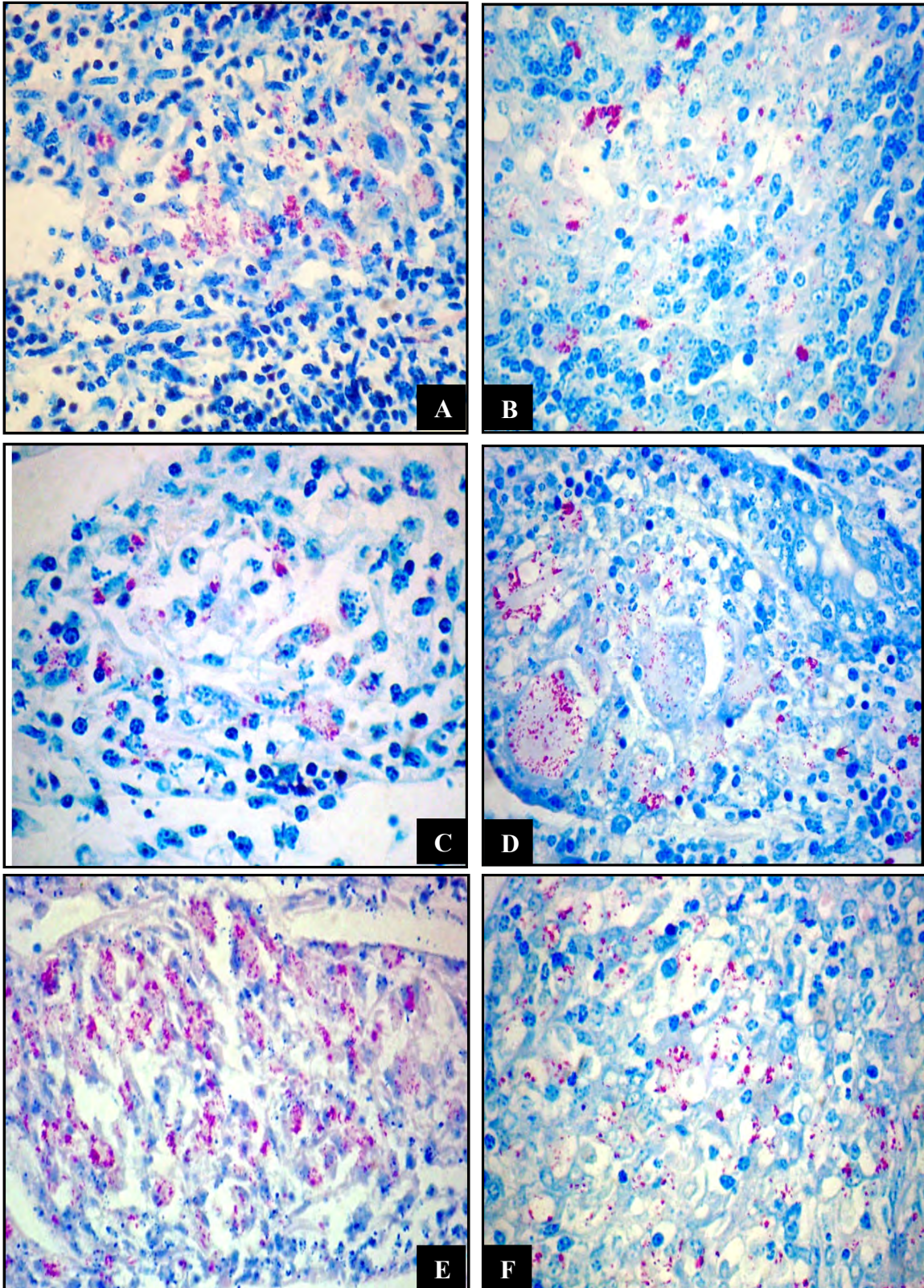


Figura 18. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A evidência de bacilos álcool-ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen foi similar nos dois fixadores avaliados em seções de íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Obj. 20x.

SOLUÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%

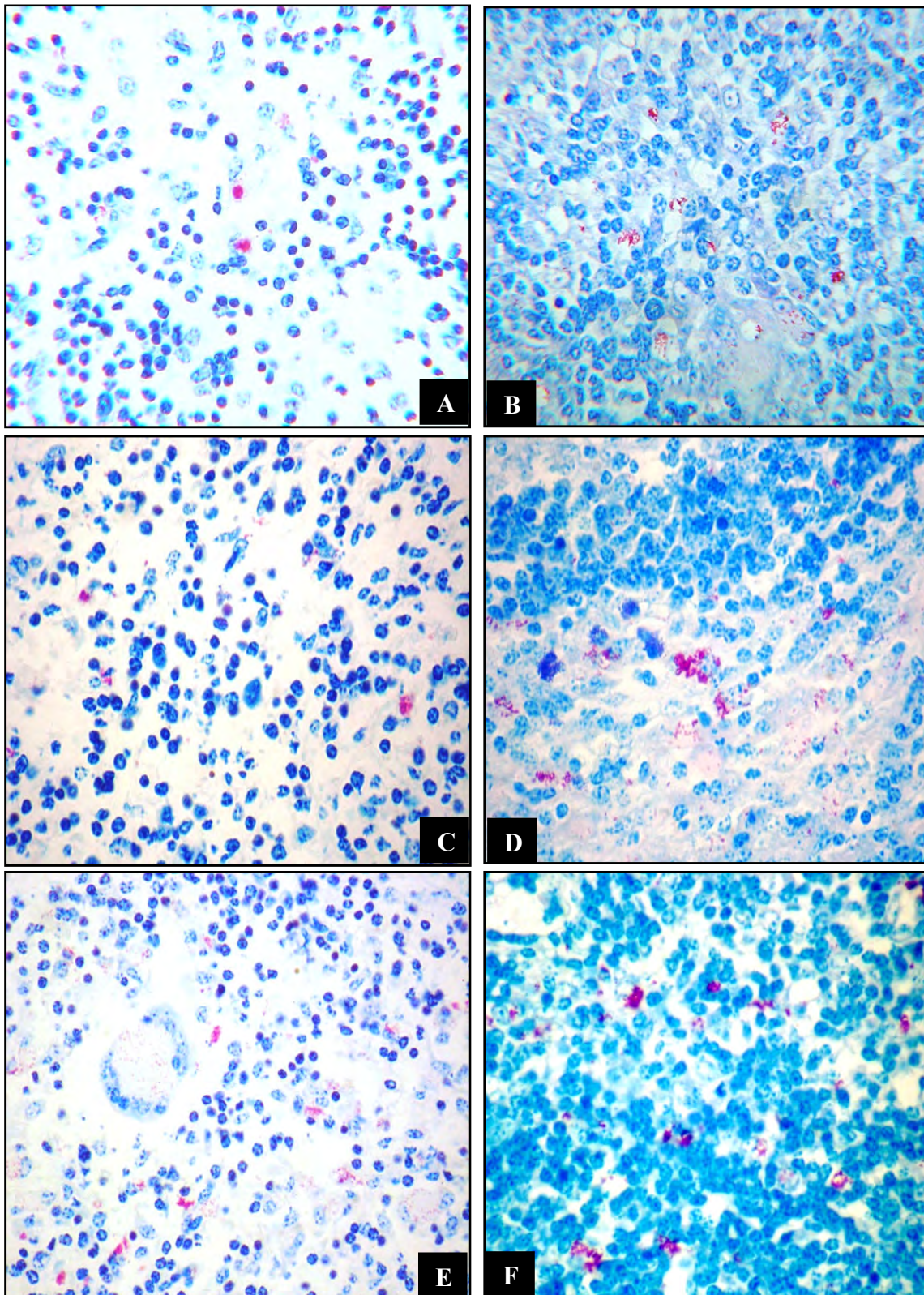


Figura 19. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. A evidenciação de bacilos álcool-ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen foi similar nos dois fixadores avaliados. Linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo: A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. Vaca 383, Rebanho A. Obj. 20x.

4.5 Imuno-histoquímica

A intensidade da imunorreação foi classificada subjetivamente em leve, moderada e acentuada, de acordo com a comparação feita com o controle positivo, cujo fragmento intestinal (porção de íleo) era proveniente de vaca com sinais clínicos típicos da paratuberculose e que, apresentava infiltração granulomatosa com presença de células gigantes de Langhans e a coloração de ZN era de intensidade leve. Neste fragmento BAAR não estavam nítidos e, quando submetido ao teste de IHQ, observou-se marcação positiva para *Mycobacterium* spp (Figura 20).

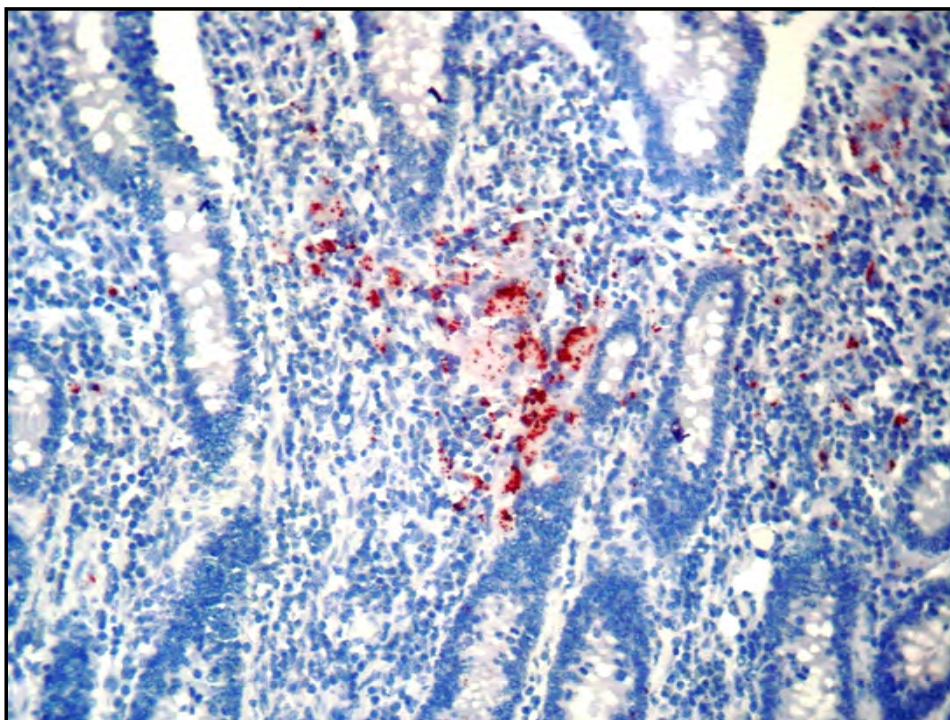


Figura 20. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Controle positivo do teste de imuno-histoquímica para *Mycobacterium* spp. Íleo de vaca com paratuberculose do Rebanho A. Vaca 500, SAP 31598, obj.40. Imuno-histoquímica, LSAB peroxidase, AEC.

4.5.1 Animais sintomáticos e assintomáticos

4.5.1.1 Bovinos sintomáticos

Os dois animais do Rebanho A e os dois animais do Rebanho B com paratuberculose clínica, apresentaram marcação positiva para *Mycobacterium* spp. no teste de imuno-histoquímica, de intensidade acentuada e moderada, respectivamente.

4.5.1.2 Bovinos assintomáticos

Rebanho A. Do total de 50 animais assintomáticos do Rebanho A, seis vacas apresentaram marcação positiva de intensidade leve a moderada para *Mycobacterium* spp em jejuno, íleo e ou linfonodo mesentérico (Figuras 21A-C) (Tabela 5), ou seja,

12% do total de animais avaliados foram positivos neste teste. Das 31 vacas que apresentaram lesões histológicas sugestivas de paratuberculose, 26% foram positivas para *Mycobacterium* spp. no teste de IHQ.

Rebanho B. Os dois bovinos assintomáticos do Rebanho B não apresentaram imunorreação no teste de IHQ, apesar da presença de lesão granulomatosa observada no intestino de um animal.

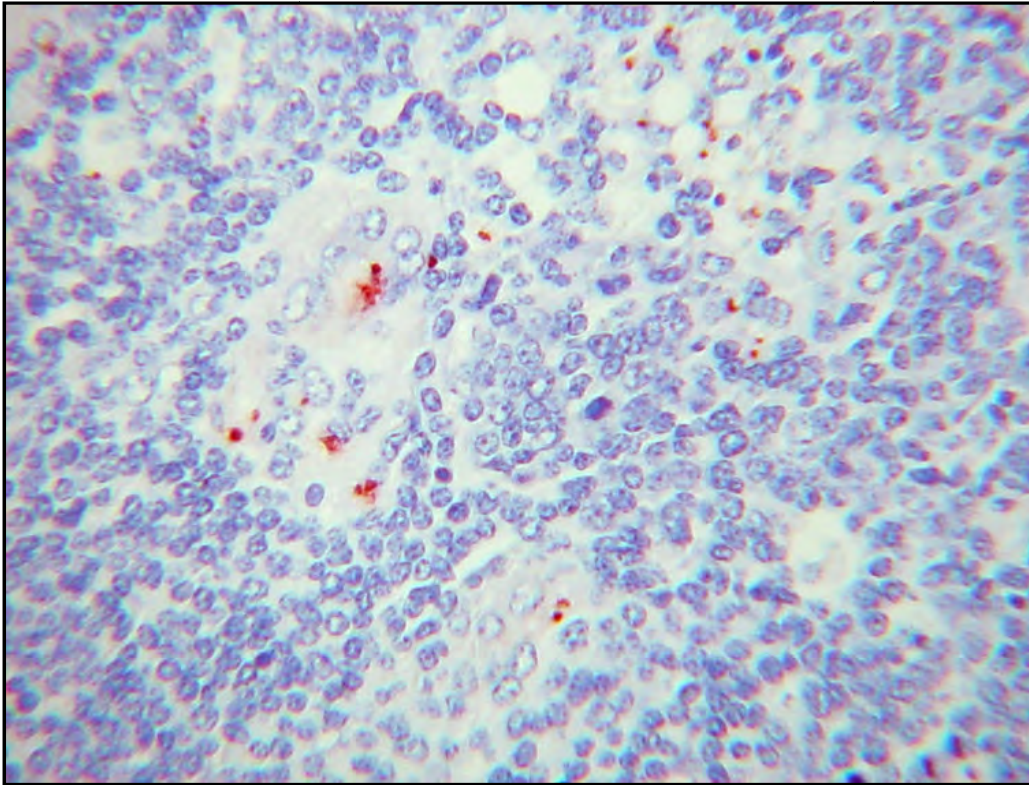


Figura 21A. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com células gigantes no linfonodo mesentérico demonstrando leve marcação positiva para *Mycobacterium* spp de bovino assintomático do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40. Imuno-histoquímica, LSAB, cromógeno AEC.

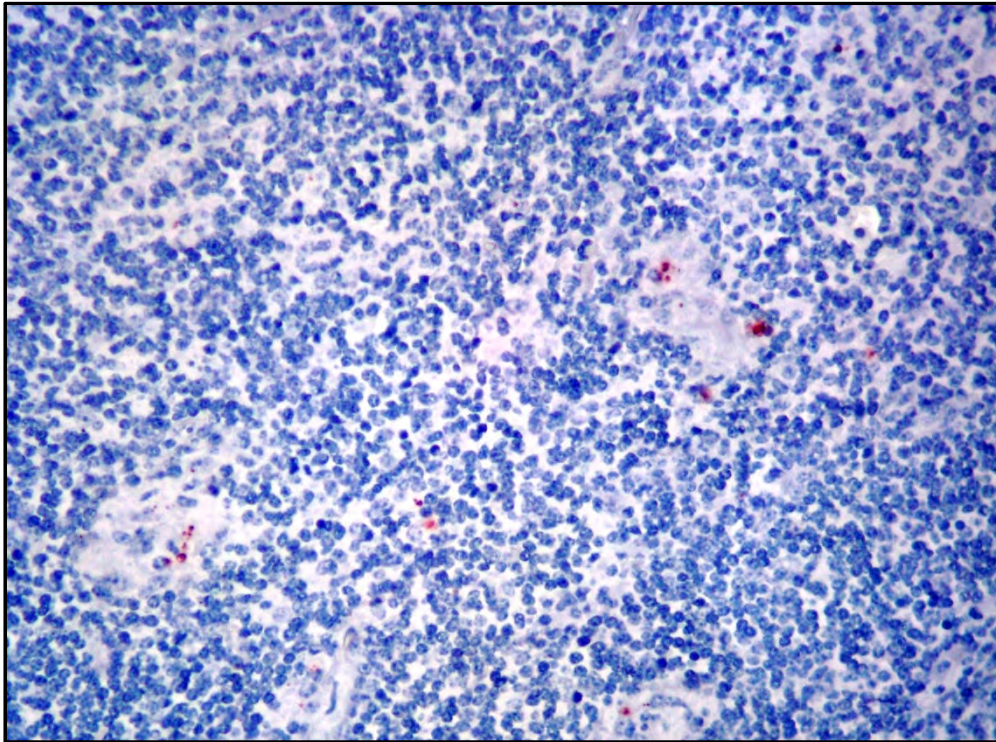


Figura 21B. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Infiltração granulomatosa com células gigantes em linfonodo mesentérico, demonstrando marcação positiva para *Mycobacterium* spp. de bovino assintomático do Rebanho A, positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40, Imuno-histoquímica, LSAB, AEC.

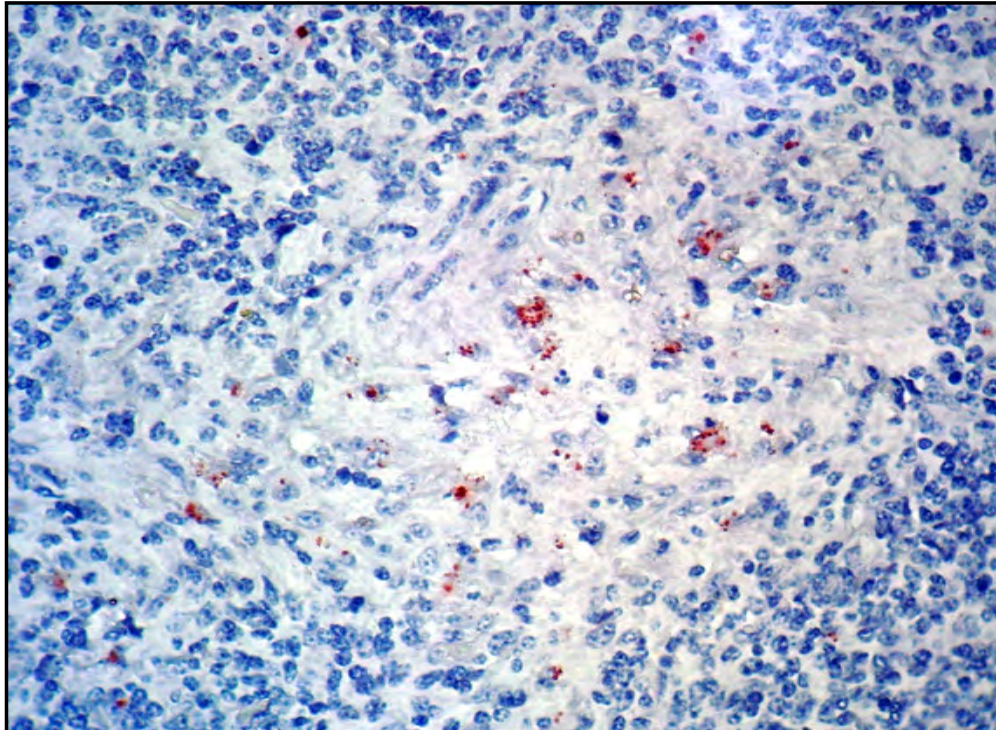


Figura 21C. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Maior aumento da infiltração granulomatosa em linfonodo mesentérico demonstrando marcação positiva para *Mycobacterium* spp. de bovino assintomático do Rebanho A positivo para paratuberculose. Vaca 524, SAP 30965, obj.40, Imuno-histoquímica, LSAB, AEC.

A Tabela 6 mostra a relação dos bovinos dos Rebanhos A e B que apresentaram resultados compatíveis com paratuberculose subclínica em diferentes testes laboratoriais.

Tabela 6. Quantidade de bovinos que apresentaram alterações compatíveis com paratuberculose em diferentes testes laboratoriais

Bovinos	Rebanho	Total de bovinos avaliados	Histopatologia		IHQ
			Lesões granulomatosas	Presença de BAARs	Mycobacterium spp
Sintomáticos	A	2	2	2	2
	B	2	2	2	2
Assintomáticos	A	50	31	0	6
	B	2	1	0	0
TOTAL	2	56	36	4	10

4.5.2 Estudo dos Fixadores de tecido

4.5.2.1 Fragmentos fixados em solução de zinco

Tecidos fixados em zinco apresentaram resultados diferentes quando comparados aos tecidos fixados em formol e ao período de tempo em que os fragmentos foram mantidos na solução fixadora.

Fragmentos com períodos de fixação de 24 horas e 2 meses apresentaram marcação positiva na IHQ, claramente distinguível, quando analisados ao microscópio óptico. No entanto, secções mantidas na solução fixadora por 16 meses, revelaram marcação insatisfatória em relação à clareza e nitidez da imunorreação. Observou-se que, após tratamento das secções para a IHQ, o tecido (principalmente fragmentos de íleo) sofreu danos, demonstrado pela perda da estrutura histológica e da afinidade tintorial à hematoxilina (Figuras 22 e 23).

4.5.2.2 Fragmentos fixados em solução de formol

Fragmentos fixados em formol a 10% nos três diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) em que foram mantidos na solução fixadora, não apresentaram diferenças significativas na intensidade da imunomarcção, tanto em secções íleo quanto em linfonodo mesentérico (Figuras 22 e 23).

A tabela abaixo (Tabela 7) mostra o resultado geral dos parâmetros analisados neste estudo, em tecidos fixados em zinco e em formol, e em diferentes períodos de tempo em que os fragmentos ficaram imersos na solução fixadora.

Tabela 7. Quadro geral com os resultados da análise histomorfológica (hematoxilina-eosina e coloração de Ziehl-Neelsen), imuno-histoquímica e PCR GAPDH, IS900 e f57, de íleo e linfonodo mesentérico fixados em solução de zinco e em formol, e incluídos em parafina

Tempo na solução fixadora	Tecido	Arquitetura celular		Coloração de Ziehl-Neelsen		Imuno- histoquímica <i>Mycobacterium</i> spp		PCR GAPDH		PCR IS900 e F57	
		Zinco	Formol	Zinco	Formol	Zinco	Formol	Zinco	Formol	Zinco	Formol
24 horas	Íleo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	LM	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2 meses	Íleo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	LM	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
16 meses	Íleo	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	LM	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

+: Resultado positivo; -: resultado negativo; LM: linfonodo mesentérico

SOLUÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%

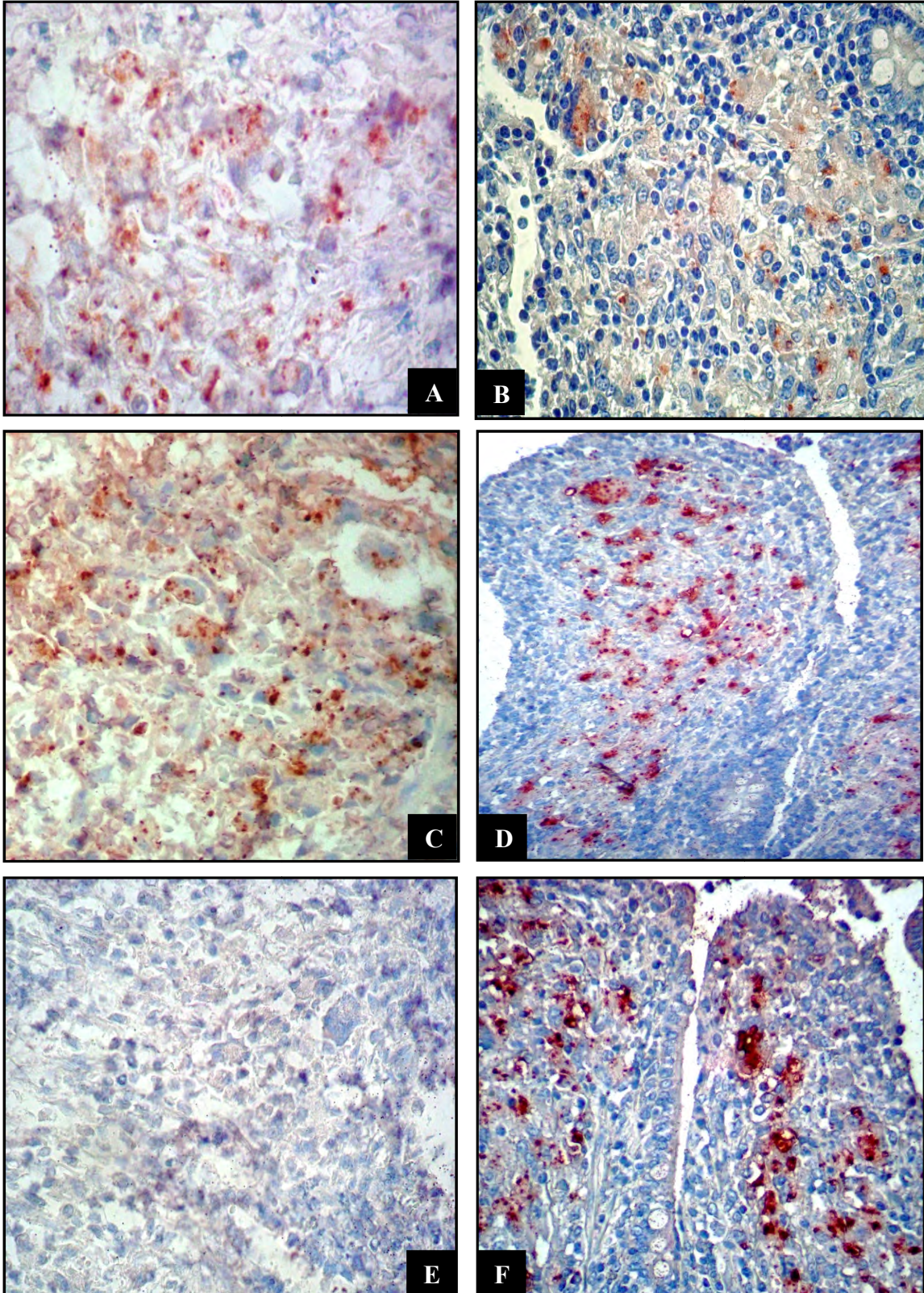


Figura 22. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. O teste de imuno-histoquímica para *Mycobacterium* spp. foi positivo para os dois fixadores avaliados, no entanto, fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco não revelou marcação. Íleo de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados em solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo, A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. LSAB peroxidase, AEC.

SOLUÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÃO DE FORMOL A 10%

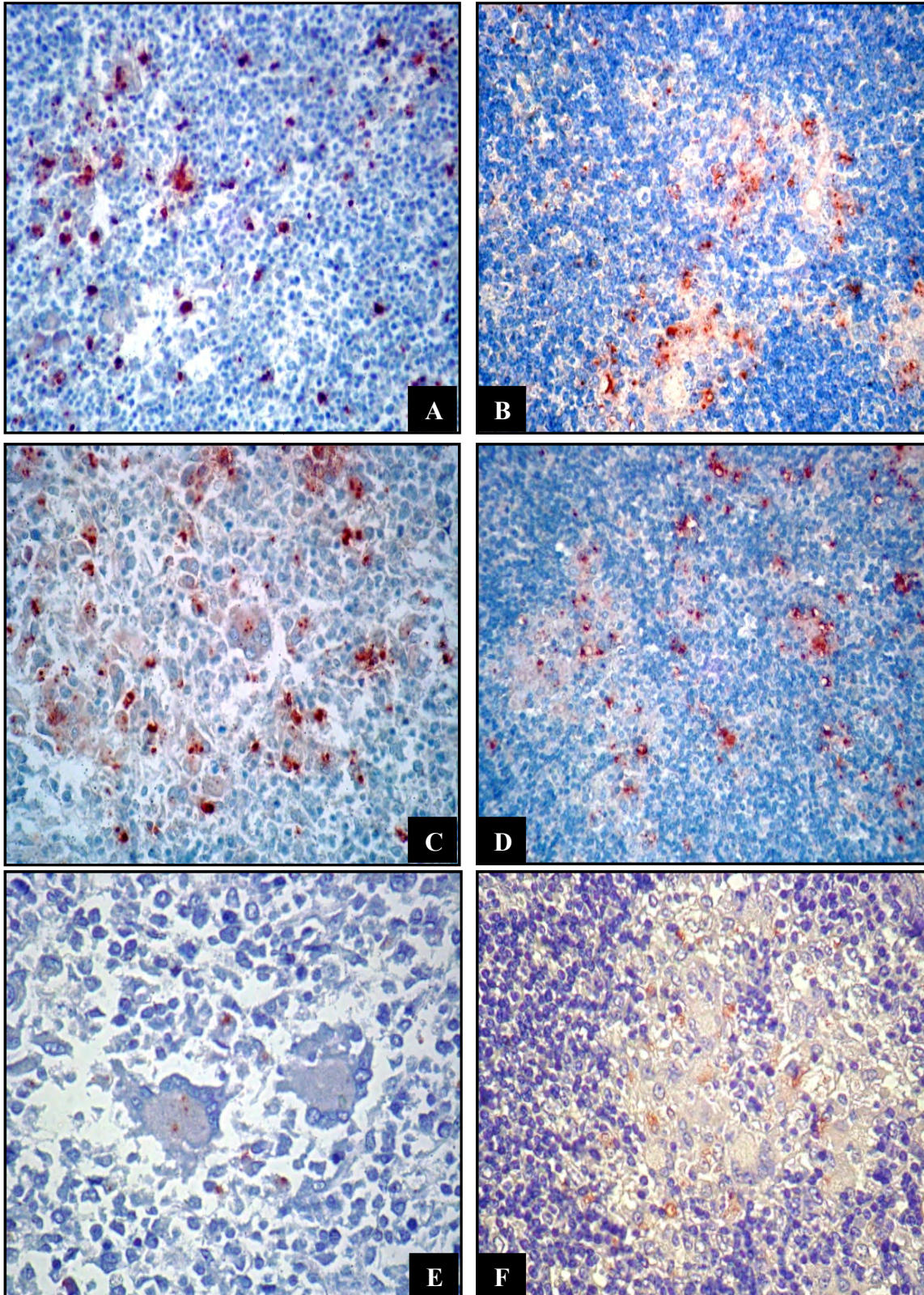


Figura 23. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco apresentaram diminuição da intensidade de marcação para *Mycobacterium* spp. no teste de imuno-histoquímica. Linfonodos mesentéricos de bovino com paratuberculose (Vaca 383, Rebanho A), fixados na solução de zinco e de formol a 10% em diferentes períodos de tempo, A e B: 24 horas, C e D: 2 meses, E e F: 16 meses. LSAB peroxidase, AEC.

4.6 PCR

4.6.1 Animais sintomáticos e assintomáticos

Fragmentos coletados de vacas com sinais clínicos da paratuberculose, e que foram fixados em formol foram submetidos à PCR, no entanto, não foi possível obter resultados positivos na PCR GAPDH (DNA de bovino) e IS900. A partir deste resultado, fragmentos de intestino e linfonodo mesentérico de bovinos assintomáticos não foram avaliados por esta metodologia, pois o fixador utilizado foi o formol. No estudo da paratuberculose subclínica não foi utilizado a solução de zinco.

4.6.2 Estudo dos fixadores de tecido

4.6.2.1 Eletroforese do DNA extraído

A eletroforese revelou presença de DNA de alto peso molecular em amostras fixadas em zinco por 24 horas e em fragmentos mantidos por 2 meses na solução fixadora, resultados similares foram observados na extração por kit comercial e por fenol-clorofórmio. Resultado semelhante, no entanto em menor intensidade de marcação, foi observada em amostras fixadas em formol submetidas à extração por kit comercial. A extração de DNA por fenol-clorofórmio de amostras fixadas em formol não revelou resultados positivos. Já os fragmentos de tecido com 16 meses imersos tanto na solução de zinco quanto de formol, demonstraram marcada degradação dos ácidos nucleicos. Resultados similares foram observados na extração por kit comercial e por fenol-clorofórmio (Figura 24).

4.6.2.2 Pureza do DNA extraído de amostras fixadas

A qualidade do DNA extraído foi estimada a partir da relação A_{260}/A_{280} , obtido pela espectrofotometria; o valor de 1,8 representa qualidade satisfatória do material extraído em relação à contaminação por proteínas nas amostras analisadas.

4.6.2.2.1 Extração por fenol-clorofórmio

A maioria das amostras apresentou valor próximo a 1,8 (Tabela 8);

4.6.2.2.2 Extração por kit-comercial

A maioria das amostras apresentou valor próximo a 1,8, no entanto algumas revelaram dados discrepantes tais como valor próximo à 3,0 (amostras 5, 13, 20 e 23) e 9,0 (amostra 19) (Tabela 8);

Figura 24. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Eletroforese em gel de Ágar de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol, extraídos por kit comercial e fenol-clorofórmio



Legenda. Amostras 1-12: tecidos fixados em zinco e 13-24: tecidos fixados em formol; Amostras 1-6, 13-18: extração por kit comercial; Amostras 7-12, 19-24: extração por fenol-clorofórmio; Amostras 1-2, 7-8, 13-14, 19-20: 24 horas na solução fixadora; Amostras 3-4, 9-10, 15-16, 21-22: 2 meses a solução fixadora; Amostras 5-6, 11-12, 17-18, 23-24: 16 meses a solução fixadora; Amostras 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 íleo; Amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24: linfonodo mesentérico; A: 50ng de DNA λ ; B: 100ng de DNA λ ; C: 150ng de DNA λ ; M: DNA ladder 1 kb (kilobase)

Tabela 8. Dados obtidos na espectrofotometria de amostras de DNA de tecidos de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco e de formol, extraído por kit comercial e fenol-clorofórmio

			Nucleic Acid ng/μL		A260		A280		260/280		260/230		
			Fenol-clorofórmio	Kit	Fenol-clorofórmio	Kit	Fenol-clorofórmio	Kit	Fenol-clorofórmio	Kit	Fenol-clorofórmio	Kit	
Período na Solução Fixadora	24H	1	Zinco Ileo	41,9	-	0,838	-	0,537	-	1,56	-	1,82	-
		2	Zinco Ileo	425,6	94,5	8,512	1,89	4,496	0,989	1,89	1,91	2,17	1,64
		3	Zinco LM	1098,2	255,1	21,964	5,101	11,5	2,678	1,91	1,91	2,23	1,89
		4	Zinco LM	1550	-	30,999	-	16,254	-	1,91	-	2,23	-
		5	Formol íleo	167,9	6,3	3,357	0,126	1,75	0,043	1,92	2,93	2,06	0,13
		6	Formol íleo	117,9	13,5	2,358	0,269	1,235	0,133	1,91	2,03	2,03	0,66
		7	Formol LM	138,3	55,9	2,766	1,118	1,497	0,622	1,85	1,8	2,04	1,31
		8	Formol LM	175	26	3,5	0,519	1,873	0,284	1,87	1,83	2,1	0,65
	2 meses	9	Zinco Ileo	141,5	64	2,831	1,281	1,536	0,679	1,84	1,89	2,12	1,94
		10	Zinco Ileo	105,1	80,8	2,102	1,617	1,186	0,858	1,77	1,89	2,07	1,83
		11	Zinco LM	727,4	219,6	14,547	4,392	7,717	2,298	1,89	1,91	2,27	2,1
		12	Zinco LM	753,7	207,6	15,074	4,151	7,953	2,187	1,9	1,9	2,28	1,82
		13	Formol íleo	95,4	1,8	1,908	0,037	1,063	0,012	1,79	3,02	2	0,25
		14	Formol íleo	71	5,9	1,42	0,118	0,805	0,063	1,76	1,87	1,98	0,41
		15	Formol LM	118,6	10,7	2,373	0,214	1,358	0,125	1,75	1,71	1,98	0,98
		16	Formol LM	89	14,9	1,781	0,299	1,028	0,166	1,73	1,8	2,03	0,8
	16 meses	17	Zinco Ileo	140	2,3	2,8	0,046	1,532	0,023	1,83	2,04	2,12	0,26
		18	Zinco Ileo	101,4	6,5	2,029	0,129	1,144	0,073	1,77	1,77	1,95	0,26
		19	Zinco LM	33,7	2	0,674	0,04	0,464	0,004	1,45	9,4	1,72	0,17
		20	Zinco LM	244,7	1,5	4,895	0,031	2,688	0,01	1,82	3,02	2,14	0,11
		21	Formol íleo	130,7	1,5	2,614	0,031	1,53	0,013	1,71	2,39	2,02	0,04
		22	Formol íleo	-	1,1	-	0,023	-	0,014	-	1,68	-	0,11
		23	Formol LM	257	1,4	5,141	0,028	3,152	0,007	1,63	3,8	2,11	0,13
		24	Formol LM	162,9	5	3,259	0,1	1,986	0,052	1,64	1,91	2,08	0,52
25	Formol C-	74,3	16,3	1,486	0,326	0,875	0,196	1,7	1,66	1,99	0,9		
26	Formol C-	-	23,4	-	0,468	-	0,261	-	1,79	-	1,49		

4.6.2.3 PCR GAPDH

A PCR GAPDH foi realizada com o intuito de verificar a integridade do DNA bovino tecidual após o processo de fixação nas duas soluções analisadas. A última diluição detectada pelo teste foi de 10^{-3} e 10^{-4} , o que corresponde a aproximadamente 15pg/ul e 3,3pg/ul, respectivamente para as amostras 1 e 2. Os dados obtidos pela espectrofotometria de amostra de sangue bovino extraído por kit comercial estão listados na tabela 9.

Tabela 9. Resultado da espectrofotometria de DNA extraído de amostras de sangue bovino, utilizado para controle positivo da PCR GAPDH

Amostra	Concentração do ácido nucleico ng/ul	A 260	A 280	260/280	260/230
1	15	0,3	0,165	1,82	1,07
2	33,5	0,67	0,368	1,82	1,37

4.6.2.3.1 Tecidos fixados em zinco

Os tecidos fixados em solução de zinco resultaram em amplificação de fragmento GAPDH específico para DNA bovino. Fragmentos fixados por 24 horas e os que foram mantidos por 2 meses imersos na solução de zinco demonstraram resultados positivos, em que a última diluição detectada foi de 10^{-4} (Tabela 10). No entanto, verificou-se que fragmentos que foram mantidos por 16 meses na solução de zinco apresentaram significativa degradação, pois a última diluição detectada pela PCR foi de 10^{-1} (Tabela 10).

4.6.2.3.2 Tecidos fixados em formol

Ao contrário do observado na fixação por zinco, verificou-se que, todos os tecidos fixados em formol não resultaram em amplificação do fragmento de DNA bovino adotado neste estudo.

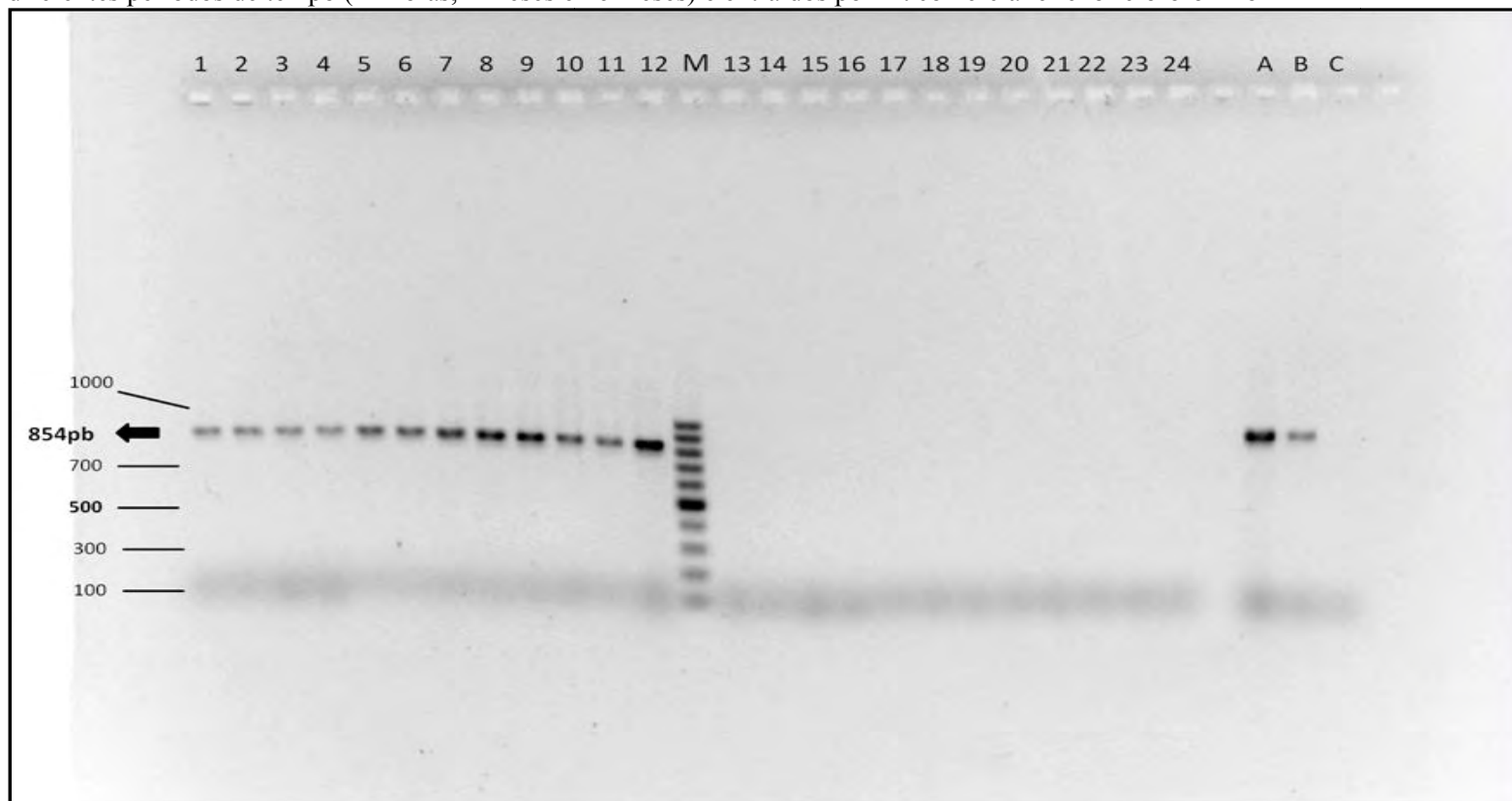
Os dados obtidos na PCR GAPDH de amostras fixadas em zinco e em formol, estão listadas na tabela 10.

Tabela 10. Resultados da PCR GAPDH de fragmentos de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco e de formol, e incluídos em parafina

PCR GAPDH									
Período na Solução Fixadora	Método de Extração do DNA	Íleo				Linfonodo Mesentérico			
		Amostra	Solução de Zinco*	Amostra	Solução de Formol	Amostra	Solução de Zinco*	Amostra	Solução de Formol
24 horas	Kit	3	10 ⁻⁴	5	---	4	10 ⁻⁴	7	---
	Fenol-clorofórmio	2	10 ⁻²	5	---	3	10 ⁻²	7	---
2 meses	Kit	9	10 ⁻⁴	13	---	11	10 ⁻⁴	15	---
	Fenol-clorofórmio	9	10 ⁻⁴	13	---	11	10 ⁻⁴	15	---
16 meses	Kit	17	10 ⁻¹	21	---	19	10 ⁻¹	23	---
	Fenol-clorofórmio	17	10 ⁻¹	21	---	19	10 ⁻¹	23	---

*: última diluição detectada pela PCR; ---: resultado negativo

Figura 25. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Resultado da PCR GAPDH de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídos por kit comercial e fenol-clorofórmio



Legenda: Amostras 1-12: tecidos fixados em zinco e 13-24: tecidos fixados em formol; Amostras 1-6, 13-18: extração por kit comercial; Amostras 7-12, 19-24: extração por fenol-clorofórmio; Amostras 1-2, 7-8, 13-14, 19-20: 24 horas na solução fixadora; Amostras 3-4, 9-10, 15-16, 21-22: 2 meses a solução fixadora; Amostras 5-6, 11-12, 17-18, 23-24: 16 meses a solução fixadora; Amostras 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23: íleo; Amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24: linfonodo mesentérico; M: DNA ladder 100 pb (pares de base); A: Controle positivo, DNA de bovino referente à 150 μ g/ μ L; B: Controle positivo, DNA de bovino referente à 15 μ g/ μ L; C: Controle negativo

4.6.2.4 PCR IS900 e F57

4.6.2.4.1 Sensibilidade do teste

A quantificação do DNA do controle positivo (Map isolado em HEYM no Labacvet-UFRGS) realizada em espectrofotômetro, seguido de testes realizados a partir de diluições seriadas (10^{-1}), demonstrou que a PCR IS900 e F57 foram capazes de detectar, respectivamente, 40fg/ μ L e 4pg/ μ L de DNA de Map. A última diluição detectada pelo protocolo adotado foi de 10^{-6} e 10^{-4} , respectivamente.

4.6.2.4.2 Amostras fixadas na solução de zinco

Todas as amostras fixadas em zinco demonstraram amplificação dos fragmentos de inserção IS900 (Figura 26) e F57 (Figura 27), independente do período de tempo da fixação, tanto na extração por fenol-clorofórmio quanto na extração por kit comercial (Tabela 11). A intensidade das bandas foi semelhante nos três períodos de tempo (24 horas, 4 meses e 16 meses); além disso, observou-se maior intensidade das bandas nas amostras extraídas por kit comercial.

A Tabela 12 mostra os resultados positivos correspondentes à última diluição das amostras de DNA, detectada pelos protocolos da PCR GAPDH, IS900 e F57, adotados neste estudo.

4.6.2.4.3 Amostras fixadas na solução de formol

Ao contrário dos resultados obtidos em secções fixadas em zinco, nenhuma das amostras fixadas em formol demonstrou resultados positivos a PCR IS900 (Tabela 11).

Tabela 11. Dados obtidos na PCR IS900, de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose fixados em solução de zinco e de formol e incluídos em parafina

PCR IS900									
Período na Solução Fixadora	Método de Extração do DNA	Íleo				Linfonodo Mesentérico			
		Amostra	Solução de Zinco*	Amostra	Solução de Formol	Amostra	Solução de Zinco*	Amostra	Solução de Formol
24 horas	Kit	3	10 ⁻³	5	---	4	10 ⁻⁴	7	---
	Fenol-clorofórmio	2	10 ⁻²	5	---	3	10 ⁻⁴	7	---
2 meses	Kit	9	10 ⁻³	13	---	11	10 ⁻⁴	15	---
	Fenol-clorofórmio	9	10 ⁻²	13	---	11	10 ⁻³	15	---
16 meses	Kit	17	10 ⁻²	21	---	19	10 ⁻⁴	23	---
	Fenol-clorofórmio	17	10 ⁻³	21	---	19	10 ⁻⁴	23	---

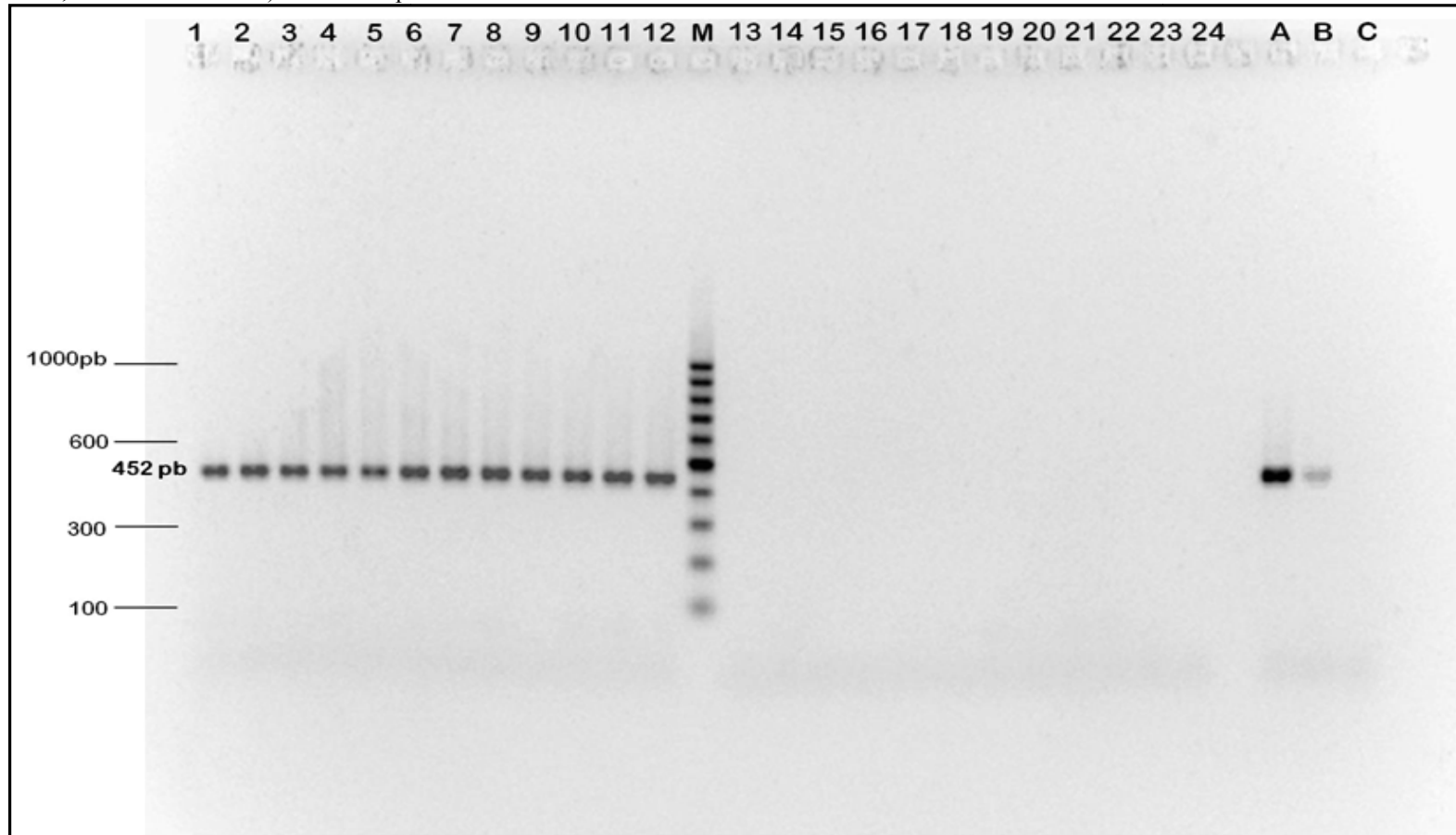
*, última diluição detectada pela PCR

Tabela 12. Resultados da PCR GAPDH, IS900 e F57 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixados em solução de zinco

Extração por	Kit						Fenol-clorofórmio					
	24h		2meses		16meses		24h		2meses		16meses	
Tecido	Íleo	Linfonodo Mesentérico	Íleo	Linfonodo Mesentérico	Íleo	Linfonodo Mesentérico	Íleo	Linfonodo Mesentérico	Íleo	Linfonodo Mesentérico	Íleo	Linfonodo Mesentérico
GAPDH*	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹
IS900*	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴
F57*	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹

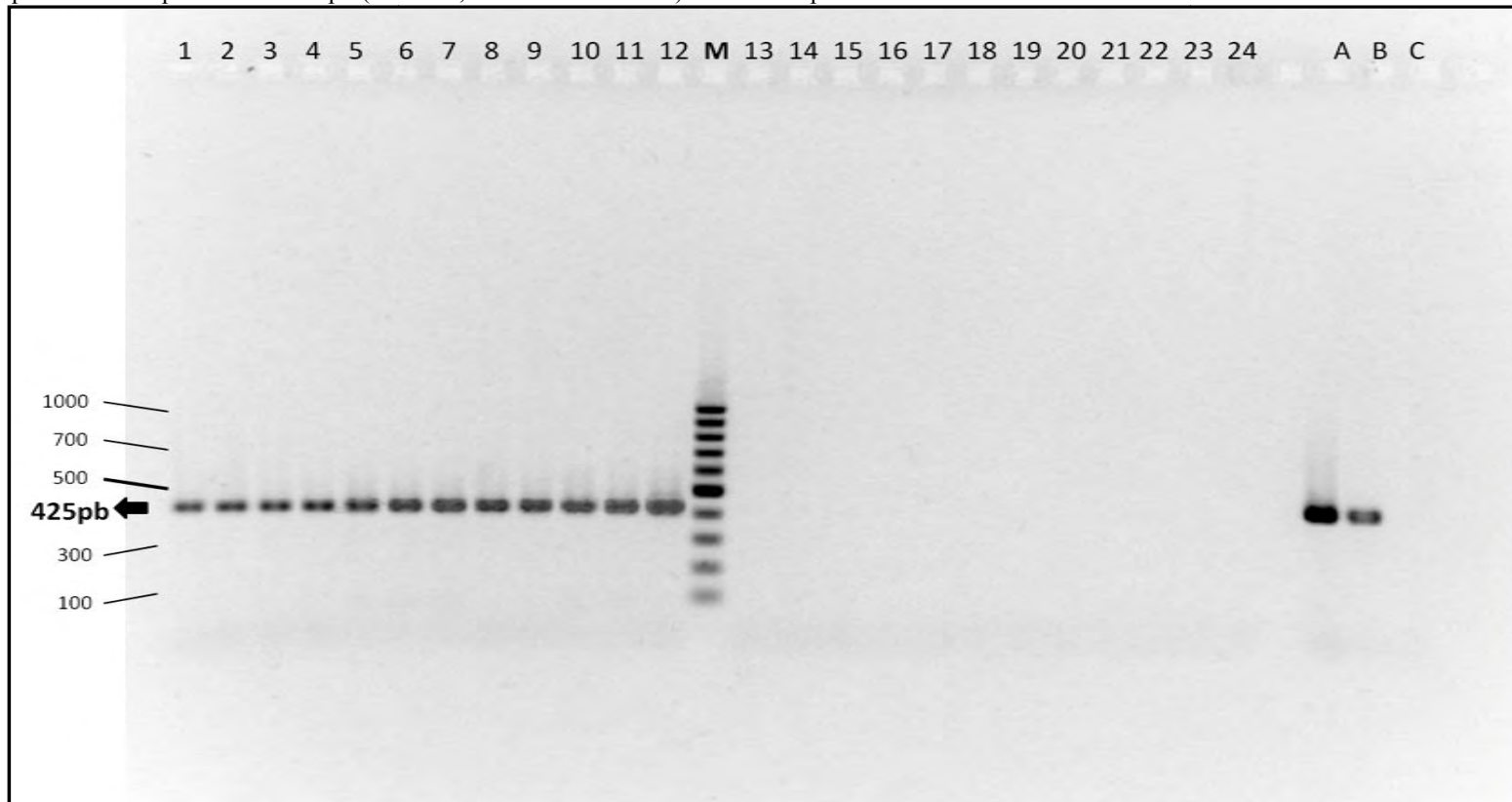
* Última diluição detectada pelo protocolo de PCR adotado neste estudo.

Figura 26. Diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e molecular da paratuberculose subclínica em bovinos. Resultado da PCR IS900 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídos por kit comercial e fenol-clorofórmio



Legenda: Amostras 1-12: tecidos fixados em zinco e 13-24: tecidos fixados em formol; Amostras 1-6, 13-18: extração por kit comercial; Amostras 7-12, 19-24: extração por fenol-clorofórmio; Amostras 1-2, 7-8, 13-14, 19-20: 24 horas na solução fixadora; Amostras 3-4, 9-10, 15-16, 21-22: 2 meses a solução fixadora; Amostras 5-6, 11-12, 17-18, 23-24: 16 meses a solução fixadora; Amostras 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23: íleo; Amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24: linfonodo mesentérico; **M:** DNA ladder 100 pb (pares de base); **A:** Controle positivo, DNA de Map referente à 400fg/ μ L; **B:** Controle positivo, DNA de Map referente à 40fg/ μ L; **C:** Controle negativo

Figura 27. Resultado da PCR F57 de amostras de íleo e linfonodo mesentérico de bovino com paratuberculose, fixadas em zinco e em formol por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídos por kit comercial e fenol-clorofórmio



Legenda: Amostras 1-12: tecidos fixados em zinco e 13-24: tecidos fixados em formol; Amostras 1-6, 13-18: extração por kit comercial; Amostras 7-12, 19-24: extração por fenol-clorofórmio; Amostras 1-2, 7-8, 13-14, 19-20: 24 horas na solução fixadora; Amostras 3-4, 9-10, 15-16, 21-22: 2 meses a solução fixadora; Amostras 5-6, 11-12, 17-18, 23-24: 16 meses a solução fixadora; Amostras 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23: íleo; Amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24: linfonodo mesentérico; **M:** DNA ladder 100 pb (pares de base); **A:** Controle positivo, DNA de Map referente à 40pg/μL; **B:** Controle positivo, DNA de Map referente à 4pg/μL; **C:** Controle negativo

5 DISCUSSÃO

5.1 Paratuberculose Subclínica

O diagnóstico precoce da paratuberculose é de importância primordial para o controle da infecção e possível erradicação da paratuberculose em um rebanho; uma das principais características da doença de Johne é que os sinais clínicos se manifestam quando o animal encontra-se no estágio terminal da infecção e elimina grande quantidade de Map no ambiente através das fezes diarreicas. A detecção de indivíduos infectados e assintomáticos e, seu posterior abate, aumenta a eficiência das medidas controle, minimizando desta forma, a infecção de novos animais e perpetuação da infecção no rebanho (OIE, 2012). No entanto, os testes diagnósticos existentes não são sensíveis o suficiente para detectar a fase assintomática ou subclínica da infecção (CHIODINI, VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984; COCITO et al., 1994; OIE, 2012), sendo necessário mais de uma metodologia (OIE, 2012).

Neste estudo, todos os bovinos abatidos eram oriundos de propriedades positivas para a doença de Johne, uma localizada no município de Rio Claro e a outra no município de Barra Mansa, na região sul do estado do Rio de Janeiro, e foram descartados do rebanho por apresentarem alterações secundárias ao comprometimento imunológico, possivelmente associado à infecção por Map, os quais inviabilizariam a sua manutenção no plantel. Lesões histológicas características da enfermidade causadas por Map foram observadas em alguns animais e sua presença foi confirmada pelo teste de imuno-histoquímica (Tabela 5). Os bovinos deste estudo que apresentaram histopatologia compatível com a doença de Johne, tinham entre 4 e 10 anos de idade (Tabela 4 e 5), no entanto, não foi possível estimar o período de incubação (tempo entre a infecção e o aparecimento das lesões), a dose de Map ingerida pelos indivíduos positivos, se estes animais se infectaram quando jovens ou na idade adulta, ou ainda, se são resistentes ao desenvolvimento de lesões acentuadas. Tais parâmetros poderiam auxiliar no delineamento de estratégias de controle em rebanhos infectados a fim de minimizar as possibilidades de ingestão de Map, selecionar indivíduos resistentes à infecção pelo agente e ou estabelecer manejo diferenciado na propriedade. Alguns pesquisadores reproduziram lesões em bezerros e bovinos adultos após inoculação de Map por via oral, que variaram quanto à dose infectante de Map administrada, período de incubação, grau de disseminação da infiltração granulomatosa, assim como a presença de macrófagos epitelioides e células gigantes (GILMOUR; NISBET; BROTHERSTON, 1965; PAYNE; RANKIN, 1961a; PAYNE; RANKIN, 1961b; TAYLOR, 1953a; TAYLOR, 1953b).

5.1.1 Macroscopia

5.1.1.1 Bovinos sintomáticos

Bovinos com sinais clínicos evidentes apresentaram, à necropsia, alterações macroscópicas compatíveis com paratuberculose, já amplamente descritas por diversos autores (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; DACORSO-FILHO et al., 1960; DRIEMEIER et al., 1999; JACINTHO et al., 2009; MOTA et al., 2007; PORTUGAL et al., 1979; RISTOW et al., 2006; YAMASAKI et al., 2010). Estas lesões foram confirmadas pela histopatologia, imuno-histoquímica e por PCR IS900 e F57. É válido ressaltar que a PCR resultou positiva apenas em tecidos fixados em zinco.

5.1.1.2 Bovinos assintomáticos

A macroscopia dos animais assintomáticos não demonstrou lesões típicas de paratuberculose; foram observadas alterações inespecíficas na mucosa intestinal como avermelhamento e presença de elevações, aspecto levemente espessado do intestino, e aumento de volume das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos. O avermelhamento observado na mucosa intestinal, assim como o aumento dos nódulos linfóides e dos linfonodos mesentéricos podem estar associados à presença de helmintos e ou a processos inflamatórios inespecíficos, relacionado à exposição a inúmeros antígenos, comumente presentes na luz intestinal. Além disso, Driemeier et al. (1999) ressaltaram a importância da diferenciação entre espessamento das alças intestinais decorrente de patologia daquelas alterações “post-mortem” devido ao “rigor mortis”.

Infecções experimentais com Map em bovinos não produziram lesões macroscópicas após 14 meses da infecção (PAYNE; RANKIN, 1961a; PAYNE; RANKIN, 1961b; GILMOUR; NISBET; BROTHERSTON, 1965), à semelhança deste estudo, em que não foram observadas alterações macroscópicas sugestivas de paratuberculose. No entanto, à histopatologia os autores relataram presença de leve infiltração granulomatosa compatível com a fase inicial da doença de Johne, características estas também observadas nos animais deste estudo.

5.1.2 Citopatologia da mucosa intestinal

A citopatologia realizada a partir de fezes, raspado de mucosa do jejuno, íleo e “imprint” dos linfonodos mesentéricos nos bovinos com sinais clínicos deste estudo, demonstraram a forma lepromatosa da paratuberculose; segundo a OIE (2012) é possível confirmar a infecção por esta metodologia, após visualização de lesões compatíveis com a enfermidade, à necropsia. Esta técnica é de grande valia e é vantajosa, devido ao baixo custo, à facilidade de execução e à rapidez para a confirmação do diagnóstico. No entanto, geralmente BAARs são visualizados apenas em animais na fase adiantada da infecção e apresenta baixa sensibilidade diagnóstica.

5.1.3 Histopatologia

5.1.3.1 Bovinos sintomáticos

Os bovinos deste estudo com sinais clínicos da doença de Johne apresentaram alterações anátomo-histopatológicas compatíveis com a enfermidade já amplamente descritas na literatura (BUERGELT et al., 1978; CLARKE, 1997; DRIEMEIER et al., 1999, YAMASAKI et al., 2010). Algumas variações na histopatologia de intestino e de linfonodos mesentéricos de animais infectados com Map têm sido descrita; diferentes cepas do microrganismo podem produzir lesões com variados padrões na composição das células do processo inflamatório granulomatoso. Cepas bovinas têm induzido lesões focais caracterizadas por granulomas com número considerável de células gigantes, características estas observadas nos animais deste estudo, em contrapartida, cepas de ovinos e caprinos produziram lesões multifocais e difusas sem a formação de células gigantes (CLARKE et al., 1996; PÉREZ et al., 1996; CORPA et al., 2000). Além disso, cepas bovinas e ovinas de Map mostraram diferentes características fenotípicas “in vivo” (MARSH; WHITTINGTON; COUSINS, 1999; STEWART et al., 2004) e expressam propriedades diferentes “in vitro” (WHITTINGTON et al., 1999). Verna et al.

(2007) também relataram que cepas isoladas em diferentes países (Argentina e Espanha) têm demonstrado variações na virulência e ressaltam a importância do controle da entrada e saída de animais infectados com Map, em diferentes partes do mundo, no intuito de inibir a introdução de cepas ausentes na região. O estudo molecular de Map, dos diferentes graus de lesão observados à histopatologia neste estudo, poderia revelar se a variação da intensidade das lesões estaria relacionada ou à presença de diferentes cepas do agente infeccioso ou com o estágio da infecção.

5.1.3.2 Bovinos assintomáticos

Do total de 52 bovinos assintomáticos avaliados neste estudo, 32 bovinos (61%) apresentaram lesões granulomatosas de intensidade leve em jejuno, íleo e ou linfonodos mesentéricos, observadas à histopatologia, sugestivas de paratuberculose (Tabela 5). Lesões similares foram reproduzidas experimentalmente em bovinos, por Payne e Rankin (1961a, 1961b) após um mês da administração oral de Map e por Larsen; Merkal e Cutlip (1975), após 150 dias da infecção, os quais relataram que a histopatologia revelou presença de células gigantes solitárias no ápice das vilosidades e nos linfonodos mesentéricos. Pérez; García-Marín e Badiola (1996) relataram que as classificações histológicas representam os estágios da patogênese, e o desenvolvimento e disseminação das lesões podem estar associados à idade do animal, quantidade de bactérias ingerida e efetividade da imunidade celular para controlar ou destruir as micobactérias.

Um inconveniente das técnicas de diagnóstico anátomo-patológicas é que exigem a eutanásia dos animais, em contrapartida, tem sido relatada biópsia de íleo e de linfonodo mesentérico para diagnóstico da doença de Johnne em ovinos; no entanto, deve-se levar em consideração a relação custo-benefício, pois segundo os autores, esta técnica exige conhecimento especializado e a sua utilização é conveniente apenas para animais de alto valor zootécnico (MCCONNEL et al., 2004). Além disso, Buergelt e Ginn (2000) relataram a eficiência da biópsia no diagnóstico da paratuberculose em ruminantes selvagens que se encontram em jardins zoológicos nos quais, anticorpos específicos não são detectados e os bacilos excretados através das fezes são insuficientes para o cultivo e isolamento em laboratório. Igualmente, no Brasil, biópsia de tecido retal foi realizada em bubalinos (DALTO et al., 2012). Em nosso estudo, não foram detectadas alterações histológicas no intestino grosso de nenhuma vaca assintomática. Desta forma, se for conveniente para a propriedade, pode-se sugerir a utilização de técnicas de biópsia de jejuno, íleo e ou linfonodo mesentérico para detecção de animais infectados com Map.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que é possível observar alterações histológicas em intestino delgado, principalmente em jejuno e íleo, e nos linfonodos mesentéricos em bovinos assintomáticos provenientes de rebanho positivo para paratuberculose.

5.1.4 Coloração de ZN

Neste estudo, secções intestinais e de linfonodos mesentéricos de bovinos assintomáticos, com infiltração granulomatosa e, inclusive, com formação de células gigantes de Langhans, não revelaram presença de BAARs; apesar de este teste ter baixo custo operacional e ser de fácil execução, apresenta baixa sensibilidade e evidencia apenas micobactérias com a parede celular íntegra. A ausência de bactérias nas amostras analisadas pode estar associada à presença de bactérias degradadas ou com envoltório celular deficiente (esferoplastos) como comentaram Martinson et al. (2008) e Olsen, Singurdardottir, Djonne

(2002). Ao contrário, os bovinos necropsiados com paratuberculose clínica, apresentaram inúmeros aglomerados de BAAR, característicos de Map, em secções de intestino delgado, cólon e de linfonodos mesentéricos. Neste estudo, BAARs foram facilmente observados nos casos clínicos da paratuberculose, em que estava presente grande quantidade de micobactérias; a dificuldade aumentava nos casos com poucas micobactérias, assim como relatado por Delgado et al. (2009). Alguns fragmentos corados pela técnica de ZN revelaram células gigantes contendo estruturas fracamente coradas pela fucsina, o que impossibilitou a confirmação da presença de BAARs.

5.1.5 Teste de imuno-histoquímica

Do total de 52 bovinos assintomáticos avaliados neste estudo, 32 apresentaram infiltração granulomatosa sugestiva de paratuberculose em intestino delgado e ou linfonodo mesentérico, e BAARs não foram evidenciados pela coloração de Ziehl Neelsen, em nenhum fragmento analisado. No entanto, quando submetidos ao teste de IHQ 6 bovinos ou seja, 11,5% do total (6/52) apresentaram marcação positiva para antígenos de *Mycobacterium* spp demonstrando, desta forma, elevada sensibilidade do teste em relação à técnica de ZN. Este achado é similar ao descrito por Coetsier; Tustin (2004) e Massone et al. (1990), em que os autores relatam a maior acurácia da IHQ quando comparado às técnicas de coloração histológica para detecção de BAARs, principalmente em casos contendo poucas micobactérias.

Ao contrário dos resultados obtidos à coloração de ZN, não tivemos dificuldade em observar as marcações das imunorreações no interior de macrófagos epitelioides e de células gigantes, tanto em casos com resultado positivo quanto negativo para presença de BAARs. Melhor acurácia no diagnóstico através de IHQ também foi descrita por Brees et al. (2000), e Paolicchi et al. (2001) em que os autores utilizaram anticorpo espécie-específico contra Map, conferindo, além de maior sensibilidade, maior especificidade ao teste.

Delgado et al. (2009) relataram um estudo comparativo entre dois testes laboratoriais para detecção de Map, o teste de IHQ e de “in situ hybridization” (ISH) em fragmentos onde não foram evidenciados BAARs. Apesar de ambos os testes mostrarem-se positivos, os autores relataram que a IHQ foi mais vantajosa em relação ao ISH, pois além da facilidade na visualização da marcação e da intensidade de células positivas, a técnica é de fácil execução. A desvantagem da ISH estava relacionada à dificuldade na identificação da hibridização positiva nos casos contendo poucos bacilos, além de exigir maior esforço e tempo do patologista para realização da leitura das lâminas. Desta forma, autores relataram que os resultados da IHQ foram mais satisfatórios em relação ao ISH, e este por sua vez, apresentou melhores resultados em relação à técnica de ZN (DELGADO et al., 2009). Ao contrário disso, Jeyanathan et al. (2006) observaram maior sensibilidade da técnica de ZN quando comparado ao ISH. Ainda, Delgado et al. (2009) ressaltaram a possível presença de esferoplastos nos fragmentos estudados, pois a ISH revelou marcações em glândulas e vasos linfáticos, as quais não foram visualizados pela técnica de ZN e IHQ.

Estudo realizado em caprinos infectados com Map também demonstrou alta percentagem de positivos na IHQ em relação à coloração de ZN para evidenciar BAAR e ao cultivo bacteriano para isolamento do agente infeccioso (THORENSEN, FALK, EVENSEN, 1994); ao contrário disso, Martinson et al. (2008) relataram que o cultivo bacteriano foi o teste mais sensível na detecção de animais infectados, quando comparado à coloração de ZN e IHQ.

Dos 32 bovinos assintomáticos que apresentaram lesões granulomatosas sugestivas de paratuberculose, apenas seis bovinos (19%) apresentaram resultados positivos no teste de

IHQ; o baixo índice de animais positivos pode estar associado ao fixador utilizado. A formalina é um fixador efetivo, de baixo custo, destrói a maioria dos agentes infecciosos, inibe a autólise e preserva a arquitetura do tecido. No entanto, uma das suas principais desvantagens é a formação de “cross-linking” das cadeias de aminoácidos (ELTOUM et al., 2001; RAMOS-VARA, 2005), ou seja, produz um “entrelaçamento” das moléculas o que pode alterar ou “esconder” os epítomos, inibindo as reações no teste de IHQ (ARNOLD et al., 1996; WERNER et al., 2000). Neste estudo, apesar das reativações antigênicas realizadas para induzir a exposição dos epítomos e otimizar a marcação (BATTIFORA; KOPINSKI, 1986; SHI et al., 1998), não foi possível obter resultados positivos na maioria dos fragmentos de intestino delgado e ou linfonodos mesentéricos com infiltração granulomatosa compatível com paratuberculose. Além disso, devem ser consideradas a quantidade e distribuição dos antígenos nas amostras analisadas, visto que, a ausência de reações não significa ausência do antígeno no tecido, que pode estar presente em níveis não detectáveis pelo protocolo adotado (RAMOS-VARA et al., 2008). Ainda, existe a possibilidade de se ter coletado áreas com ausência de lesões, já que animais assintomáticos podem não apresentar infiltração granulomatosa difusamente distribuída ao longo do trato intestinal e linfonodos mesentéricos.

As reações cruzadas com outras micobactérias não podem ser excluídas; a positividade do teste de IHQ e as características histológicas das lesões granulomatosas observadas neste estudo são compatíveis com infecção por Map; a utilização de controles positivos e negativos a cada processamento reforça a acurácia dos resultados obtidos. Infecções intestinais com *M. bovis* e *M. avium* são considerados raros em bovinos e a morfologia dos granulomas causados por estes agentes são caracterizados principalmente por necrose caseosa (GARCÍA-MARÍN et al., 1995; JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007, MCGAVIN; ZACHARY, 2007; NIEBERLE; COHRS, 1996), características estas não observados nos fragmentos deste estudo. É importante ressaltar que em outras espécies lesões decorrentes da resposta imune contra Map pode causar necrose caseosa associado à infiltração granulomatosa (MENENDEZ, 1990). Apesar da IHQ não ser um técnica comumente utilizada nos laboratórios de diagnóstico veterinário, é um teste valioso, pois possibilita a visualização do antígeno no contexto da lesão histológica o que facilita a identificação de imunorreações falso-positivas (WEBSTER et al., 2010), e confere ao teste, maior sensibilidade e especificidade ao diagnóstico.

A IHQ pode ser uma importante ferramenta laboratorial para confirmação da infecção por Map, principalmente em casos contendo poucos BAARs, não detectáveis pelo teste de ZN o que enriquece os métodos convencionais de diagnóstico histopatológico para confirmação da infecção; neste estudo o teste de IHQ apresentou maior sensibilidade em relação à coloração de ZN em fragmentos de intestino e linfonodo mesentérico de bovinos com suspeita de paratuberculose, fixados em formol e incluídos em parafina. Além disso, esta metodologia apresenta vantagens em situações onde não há disponibilidade de material para cultivo bacteriano, pois pode possibilitar a conclusão do diagnóstico.

5.2 Estudo dos Fixadores de Tecido

5.2.1 Histopatologia

Observou-se notável manutenção da histomorfologia dos tecidos fixados em zinco, com qualidade de imagem similar aos fixados em formol (Figuras 16 e 17), achados também relatado por WESTER et al. (2003). Foi visualizado leve a moderado “encolhimento” das células fixadas na solução de zinco, artefato também descrito por Benavides et al. (2006), em

estudo sobre a influência de três diferentes soluções fixadoras (formol a 10%, solução de Bouin e de zinco). Os autores avaliaram a histopatologia, a detecção por imuno-histoquímica e por PCR de Maedi Visna Vírus em ovino infectado e relataram que os fixadores preservaram a integridade de diferentes tecidos e as lesões foram facilmente caracterizadas.

O mecanismo bioquímico pelo qual o zinco interage com proteínas e ácidos nucleicos não é bem conhecido, no entanto acredita-se que a presença de íons de acetato na solução fixadora promove o mecanismo de interação caotrópica, desestabilizando a estrutura das proteínas através da interferência nas pontes de hidrogênio (LYKIDIS et al. 2007; JENSEN et al., 2010). Agentes caotrópicos são substâncias que desorganizam a estrutura tridimensional e causa desnaturação em macromoléculas, tais como proteínas, DNA e RNA, agindo sobre as interações intramoleculares não covalentes, cujo papel é de estabilizar a molécula; alguns exemplos destas interações são as pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Em contrapartida, sabe-se que íons de Zn podem estabilizar determinadas partes da estrutura terciária de proteínas quando submetidos a agentes caotrópicos (SELEVSEK et al., 2009) e neutralizar os efeitos do acetato. Jensen et al. (2010) relataram que a combinação de acetato e íons de Zn, pode promover alterações estruturais e desnaturação de proteínas em grau leve e, assim, enrigecer as proteínas presentes na membrana celular. Independentemente do mecanismo de fixação, a solução de zinco tem demonstrado melhores resultados na preservação de proteínas, DNA e RNA (LYKIDIS et al., 2007; JENSEN et al., 2010) em relação aos fixadores contendo aldeídos. E ainda, pesquisadores obtiveram bons resultados com a utilização deste fixador, em estudo que envolve análise de células por citometria de fluxo e de imagem (JENSEN et al., 2010; ZHAO et al., 2011).

5.2.2 Coloração de Ziehl-Neelsen

Neste estudo, BAARs foram igualmente demonstrados em fragmentos de intestino e de linfonodos mesentéricos de vacas com paratuberculose clínica fixados em zinco e em formol a 10%; em contrapartida, outros autores relataram melhores resultados da análise histoquímica, em tecidos fixados em zinco quando comparados àqueles fixados em formol (HICK et al., 2008; ISMAIL et al., 2003; WESTER et al., 2003).

Bacilos álcool-ácido resistentes também foram visualizados sem variações dignas de nota, nos três períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) em que os fragmentos foram mantidos nas soluções avaliadas. Ao contrário disso, os mesmos fragmentos (16 meses no fixador) apresentaram fraca ou ausência de marcação para antígenos de *Mycobacterium* spp no teste de IHQ, devido possivelmente à degradação de proteínas; resultado também, condizente com os prejuízos observados na histomorfologia e diminuição de sensibilidade da PCR GAPDH. A possível explicação da positividade do teste de Ziehl-Neelsen em tecidos mantidos por até 16 meses na solução de zinco pode estar relacionada ao fato de que, as micobactérias possuem paredes celulares com alto teor de lipídeos (cerca de 60%, principalmente de ácido micólico) que, quando tratadas pelo corante fucsina fenicada, coram-se de vermelho e persistem ao descoramento quando submetido à solução álcool-ácida (PNCQ, 2012). Possivelmente a estrutura lipídica se manteve íntegra, após 16 meses na solução de zinco, o que não foi observado com as proteínas avaliadas, neste estudo.

5.2.3 Imuno-histoquímica

5.2.3.1 Solução de zinco

Neste estudo, os tecidos mantidos por até 2 meses na solução de zinco apresentaram imunomarcção satisfatória, achados semelhantes foram relatados por Benavides et al. (2006). No entanto, verificou-se que os fragmentos de íleo fixados em zinco (Figuras 22A, B e C), após as várias etapas do processamento do teste de IHQ, demonstraram perda da arquitetura celular e da afinidade tintorial à hematoxilina, principalmente em fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco, que além de perda acentuada da histomorfologia, apresentou prejuízos na imunomarcção (Figura 22E e 23E). Isto pode estar relacionado à perda da antigenicidade do Map ou à degradação proteica frente ao longo período imerso na solução de zinco. Resultados condizentes com a degradação proteica foram observados também na PCR GAPDH, em que fragmentos mantidos por 16 meses na solução de zinco apresentaram diminuição da sensibilidade do teste.

Em geral, observou-se que tecidos fixados em zinco quando comparado aos fixados em formol, não revelaram melhoria na intensidade da marcação para *Mycobacterium* spp. Ao contrário disso, Gonzalez et al. (2001), Wester et al. (2003) e Hicks et al. (2008) relataram que tecidos fixados em zinco e incluídos em parafina demonstraram maior detecção de antígenos por IHQ em relação aos fixados em formol, pois as reações de “crosslink” foram minimizadas pela utilização de fixador composto por sais de zinco.

É interessante ressaltar que vários fatores podem influenciar nos resultados da imunohistoquímica, incluindo erros de interpretação e fatores pré-analíticos tais como utilização de diferentes fixadores, período prolongado ou inadequado de fixação, a escolha do método de reativação antigênica e do anticorpo primário adequado e, a quantidade do antígeno presente no tecido (APPLE et al., 2011).

5.2.3.2 Solução de formol a 10%

Os fragmentos de intestino e de linfonodos mesentéricos fixados em formol a 10% e submetidos à IHQ para *Mycobacterium* spp., demonstraram nitidez e clareza da imunomarcção; não houve dificuldade na identificação das reações. Estas características foram observadas em fragmentos mantidos por até 16 meses na solução de formol, sem variações dignas de nota. Apesar de, neste estudo, os fragmentos mantidos por longo período de tempo (16 meses) na solução de formol não terem apresentado prejuízos na imunorreacção, deve-se considerar que, as reações do tipo “cross-link”, que consistem no entrelaçamento intra e entre proteínas e macromoléculas, causado pelo formol pode comprometer a preservação de determinados epítomos e é considerado um sério obstáculo para a sua detecção pela IHQ (APPLE et al., 2011). Além disso, este fixador forma heteropolímeros rígidos responsáveis pela manutenção da arquitetura do tecido (COX et al., 2006; STYLIANOPOULOU et al., 2012).

5.2.4 PCR GAPDH, IS900 e F57

5.2.4.1 Extração de DNA

Materiais fixados em formol e incluídos em parafina, geralmente são mantidos por longos períodos de tempo, em arquivos de laboratórios de anatomia patológica. Este tipo de amostra biológica permite a correlação de dados histomorfológicos e moleculares, inclusive, com os aspectos clínicos e resultados terapêuticos, quando disponíveis. No entanto, para a obtenção de resultados satisfatórios, as aplicações das técnicas moleculares baseadas na detecção de DNA a partir de materiais fixados em formol e inclusos em parafina, apresentam

muitos desafios a serem vencidos (HUIJSMANS et al., 2010). A extração de DNA de micobactérias presentes em tecidos fixados em formol e parafinados é um procedimento ainda mais laborioso, devido, em parte, à camada lipídica que envolve e confere maior resistência ao microrganismo. As diferentes metodologias descritas para extração do DNA de micobactérias de tecidos fixados e parafinados são, em geral, adaptações de procedimentos realizados em materiais frescos ou obtidos de cultivo bacteriano; a qualidade e a quantidade de DNA destas amostras são comumente altas e a fragmentação do DNA durante a etapa de extração é mínima (LOESCHKE et al., 2005). Ao contrário disso, tecidos fixados em formol e parafinados, apresentam baixa qualidade do DNA, associado, em parte, à fragmentação que ocorre durante o processo de fixação e inclusão em parafina, portanto, precauções são necessárias para evitar maiores danos ao material genético no processo de extração do DNA. As metodologias de extração de DNA avaliadas neste estudo (kit comercial e fenol-clorofórmio) não apresentaram variações dignas de nota (Figura 24).

Também tem sido descrita a preservação da integridade de RNA (SCHEIDL et al., 2002) em tecidos fixados e parafinados. Aproximadamente 99% dos níveis de mRNA do tecido sofrem degradação devido ao processo de fixação e inclusão em parafina, entretanto, trabalhos demonstraram que, com a mínima quantidade de RNA restante, é possível detectar e amplificar o material genético pela técnica de Real-Time PCR (ABRAHAMSEN et al., 2003; SPECHT et al., 2001; GJERDRUM et al., 2004).

A otimização de protocolos para amplificação eficiente de fragmentos de DNA de várias espécies micobacterianas por PCR, tem sido amplamente relatada. Loeschke et al. (2005) relataram que cortes de tecido, realizados em micrótomo, com 1µm de espessura apresentaram melhores resultados ao teste PCR em relação aos cortes com 5µm de espessura, possivelmente relacionado à exposição mecânica do DNA micobacteriano nos cortes mais delgados, e/ou ação do xilol que poderia agir como solvente da camada lipídica sobre o envoltório micobacteriano, na etapa da desparafinização. Outros autores (BARCELOS; FRANCO; LEÃO, 2008) relataram que a solução de formol a 10% não tamponado diminuiu a capacidade de detecção de fragmentos de DNA de *M. tuberculosis* por PCR. SCHULZ et al. (2001) relataram que, após tentativas infrutíferas de diagnóstico por várias metodologias, tais como isolamento bacteriano e diagnóstico terapêutico com antimicrobianos, a PCR de tecido fixado em formol e incluído em parafina demonstrou resultados satisfatórios na detecção e identificação de *M. chelonae*.

Os dados obtidos neste estudo demonstraram que os tecidos fixados e parafinizados, podem representar uma rica fonte de DNA para a confirmação e conclusão do diagnóstico clínico-patológico de rotina, assim como para pesquisa em longo prazo. Melhorias na otimização de protocolos de fixação são necessárias, com o intuito de obter resultados satisfatórios e delimitar futuros padrões de referência.

5.2.4.1.1 Utilização de microesferas de vidro (“beads beating”)

Em nosso trabalho, obtiveram-se resultados positivos na extração de DNA de Map com e sem a utilização do “bead beating”, a partir de Map isolado em HEYM e de Map presente em tecidos fixados em zinco e inclusos em parafina. Porém, as mesmas amostras fixadas em zinco, quando extraídas por kit comercial e que, portanto, não foram submetidas ao “bead beating”, também resultaram positivas à PCR IS900 e F57. A facilidade e eficiência da utilização do “bead beating” para extração de DNA micobacteriano tem sido relatado em diversos trabalhos (ALDOUS et al., 2005; AMARO et al., 2008; COOK; BRITT, 2007; PATHAK et al., 2012). A combinação de “bead beating”, solução de lise, digestão por proteinase K e subsequente extração de DNA com precipitação por etanol, forneceu

resultados consistentes na PCR IS900 de fragmentos de intestino e linfonodos mesentéricos de caprino com paratuberculose, fixados em formol e incluídos em parafina, com vários graus de lesão, inclusive naqueles com pouca quantidade ou ausência de BAARs (TRIPATHI; STEVENSON, 2005) e também a partir de células infectadas “in vitro” por *M. avium avium*, *M. tuberculosis* e Map (PATHAK et al., 2012).

Apesar de ter sido adotado procedimento similar em fragmentos fixados em formol e incluídos em parafina, não se obteve resultados positivos, mesmo naquelas amostras com alta concentração de BAARs e positivo ao teste de IHQ, tanto na extração de DNA por kit comercial quanto na extração por fenol-clorofórmio. Este fato reforça a hipótese de que a fixação por formaldeído pode ter comprometido a extração eficiente do DNA e ou afetado a qualidade do ácido nucleico dos materiais deste estudo, sendo pelo “crosslink” entre as proteínas, pela fragmentação do DNA, ou ainda, pela ação do fixador sobre o envoltório micobacteriano, fatores estes que poderiam ter inibido a reação da polimerase. Testes adicionais são necessários para determinação da real causa do insucesso das reações em amostras fixadas em formol deste estudo. Portanto, os dados obtidos, sugerem que a utilização de “beads”, é uma etapa adicional e não estritamente necessária para o sucesso da PCR, levando em consideração o protocolo utilizado.

5.2.4.1.2 Qualidade e pureza do DNA extraído por kit comercial e fenol-clorofórmio

A partir dos dados obtidos pela espectrofotometria e baseado na razão A_{260}/A_{280} , a maioria das amostras fixadas tanto em formol quanto em zinco e submetidas à extração por fenol-clorofórmio, resultou em valor próximo a 1,8, o que demonstra que DNA extraído apresentava boa qualidade quanto à contaminação por proteínas e outras substâncias adversas à reação. O mesmo não foi observado na extração por kit comercial, em que algumas amostras revelaram o valor acima de 3,0 e uma amostra apresentou densidade óptica 9,0. Considerando que nenhuma amostra fixada em formol amplificou e que todas fixadas em zinco demonstraram resultados positivos ao teste PCR IS900 e f57; a razão A_{260}/A_{280} , apesar de indicar o “status” de pureza do DNA extraído, pode não ser um parâmetro confiável para determinação do sucesso das reações. Ainda, Ikonopoulous et al. (2004) relataram que a fragmentação do DNA poderia resultar em razão A_{260}/A_{280} menor que 1,8 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e, conseqüentemente, inibir a reação. Ao contrário disso, apesar os fragmentos fixadas em formol neste estudo, não apresentarem resultados positivos à PCR, a razão A_{260}/A_{280} da maioria das amostras mostraram-se dentro dos limites considerados ótimos (Tabela 8).

Baseado na confiabilidade da identificação de Map e custos para a execução do teste, Ikonopoulous et al. (2004) relataram que a extração de DNA pelo método por fenol-clorofórmio apresentou os melhores resultados em comparação ao kit comercial, em estudo realizado em amostras provenientes de bovino com paratuberculose; esta observação pode ser empregada em amostras fixadas em zinco em nosso estudo. Segundo os autores (Ikonopoulous et al., 2004), a extração por kit comercial foi igualmente eficiente ao método do fenol-clorofórmio quando avaliado por PCR; apesar do kit comercial ser menos laborioso, o alto custo é uma desvantagem importante para o diagnóstico rotineiro da enfermidade.

5.2.4.2 Solução Fixadora x PCR

5.2.4.2.1 PCR de amostras fixadas em zinco

Neste estudo, fragmentos de íleo e linfonodos mesentéricos fixados em zinco, mantidos na solução por diferentes períodos de tempo (24 horas, 2 meses e 16 meses) e extraídos tanto por kit comercial quanto por fenol-clorofórmio apresentaram resultados positivos ao teste PCR para Map (IS900 e F57) e para DNA de bovino (GAPDH). Resultados semelhantes foram obtidos por Wester et al. (2003) e Lykidis et al. (2007), em que os autores relataram que o fixador à base de zinco é capaz de preservar a qualidade do DNA genômico, inclusive, sem causar efeitos negativos no RNA. No entanto, relataram também que observaram alteração na histomorfologia, artefato também presente nas secções avaliadas neste estudo, em que a células apresentaram encolhimento, em graus leve a moderado mas, sem comprometer a avaliação histopatológica.

Wester et al. (2003) relataram que a utilização de solução fixadora baseada em sais de zinco não causou inconveniências na prática da rotina laboratorial e mostrou-se vantajosa em relação à facilidade no preparo e armazenamento da solução, baixo custo e, não menos importante, à menor toxicidade comparada ao formol. Os autores revelaram ainda que, os resultados da PCR de tecidos fixados em zinco apresentaram boa preservação do DNA genômico quando comparados aos fixados em formol; estes apresentaram amplificação insatisfatória dos fragmentos de DNA, igualmente ao observado neste estudo, possivelmente relacionado ao comprometimento da qualidade do ácido nucleico, ou pela presença de inibidores endógenos e ou exógenos à reação (HERMON-TAYLOR et al., 2000).

A manutenção de macromoléculas e ácidos nucleicos em tecidos fixados em solução de zinco, permite, inclusive, a análise por “in situ hybridization” (ISH), uma ferramenta valiosa que possibilita a expressão de genes “in situ”, o que facilita a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da enfermidade; este teste é baseado na utilização de provas de RNA para detecção da presença do mRNA complementar, usualmente em secções de tecidos (CARTER; FLETCHER; THOMPSON, 2010; STYLIANOPOULOU et al., 2012). Portanto, tecidos fixados em zinco representam um importante material biológico que pode ser arquivado em bio-bancos, tarefa normalmente realizada através do congelamento de amostras, e desta forma, elimina a necessidade de manutenção equipamentos de alto custo para o armazenamento das amostras (FERRER et al., 2007; KLOPFLEISCH; WEISS; GRUBER, 2011). Esta metodologia pode ser considerada uma ferramenta valiosa em estudos de correlação da histopatologia, expressão proteica, DNA genômico, RNA (LYKIDIS et al., 2007; WESTER et al., 2003) entre outros estudos proteômicos (SCHELLENBERGER et al., 2011), na mesma amostra, e ainda, possibilita a otimização dos testes de PCR, real-time PCR e análise proteica (LYKIDIS et al., 2007). É uma alternativa excelente ao fixador baseado em formol para a pesquisa contemporânea da patobiologia molecular (LYKIDIS et al., 2007).

Em se tratando da sensibilidade da PCR na detecção e amplificação de fragmentos de DNA após os diferentes períodos de tempo de armazenamento dos tecidos na solução de zinco (24 horas, 2 meses e 16 meses), observou-se que houve diminuição da PCR GAPDH (DNA bovino) naquelas em que foram mantidas na solução por 16 meses (Tabela 12). Ao contrário disso, não foi observada alteração significativa da sensibilidade na PCR IS900 e F57 (Tabela 12). Uma possível explicação para este resultado pode estar relacionada à degradação do DNA, pois o tamanho dos produtos da PCR GAPDH apresentava, aproximadamente, o dobro do tamanho dos “amplicons” da PCR IS900 e f57 (854, 452 e 424 pb, respectivamente). Prejuízos relacionados à qualidade proteica também foram observadas na análise histológica e imuno-histoquímica destes fragmentos (16 meses na solução de zinco). A determinação do

período tempo em que as amostras ficam viáveis quando mantidos na solução fixadora é importante, principalmente, naqueles casos em que são realizadas coletas a campo e o pesquisador não dispõe de um laboratório para análise imediata das amostras.

5.2.4.2.2 PCR de amostras fixadas em formol

Neste estudo, não foi possível obter resultados positivos ao teste de PCR, em amostras fixadas na solução de formol a 10% tamponada, tanto na análise de DNA de Map (IS900 e F57) quanto de DNA de bovino (GAPDH); isto possivelmente está associado aos efeitos deletérios que este fixador pode causar nos ácidos nucleicos e proteínas celulares, já que amostras fixadas em zinco e que foram submetidas aos mesmos tratamentos, amplificaram perfeitamente. Similarmente, resultados negativos foram observados a PCR de fragmentos incluídos em parafina de búfalos com paratuberculose, recebidos para diagnóstico em nosso laboratório. Este material foi enviado em formol, e apresentou histopatologia característica da infecção, inúmeros BAARs e marcação positiva à IHQ de *Mycobacterium* spp. O formaldeído causa desnaturação do DNA principalmente em regiões ricas em A-T, podendo criar mutações artificiais; os efeitos adversos podem aumentar com o longo tempo de fixação e diminuir a eficiência da amplificação do DNA (BEN-EZRA et al., 1991; GREER; LUND; MANOS, 1991; BRESTERS et al., 1994; SRINIVASAN et al., 2002; KIM, 2003). Outros fatores tais como pH ou concentração de sais, os quais não foram controlados neste estudo, podem também afetar a qualidade do DNA (GILBERT et al., 2007; SRINIVASAN et al., 2002). Vale relatar que a neutralização do formol foi realizada com a adição de carbonato de cálcio e que, na literatura disponível, não foi encontrado descrição sobre a desvantagem desta substância na PCR. Estudos são necessários para desvendar se as diferentes metodologias de tamponamento e neutralização do formol, rotineiramente utilizadas em laboratórios de histopatologia, podem inibir a ação da polimerase. Além disso, Huijsmans et al. (2010) relataram a importância da digestão por proteinase K para a purificação adequada do DNA extraído de amostras fixadas em formol e parafinizadas; apesar de, neste estudo ter sido empregada esta etapa no procedimento, apenas DNA proveniente de HEYM e de tecidos fixados em zinco mostraram amplificação à PCR GAPDH, IS900 e F57. Outras avaliações em relação ao tempo e temperatura de digestão, assim como utilização de diferentes concentrações e fabricantes de proteinase K são necessárias, a fim de determinar se esta etapa foi a determinante na falha das reações.

A alta concentração de DNA fragmentado é outro fator inibitório da PCR de amostras fixadas em formol; estes pequenos fragmentos podem competir com o DNA “template” (LIBORIO et al., 2005). Concentrações elevadas de fragmentos de DNA com final 3' e que não possuam tamanho suficiente para permitir amplificação, pode agir como “template” abortivo da reação, pois exerce papel competitivo pela enzima polimerase (LIBORIO et al., 2005). Além disso, em casos em que há baixa concentração de “template”, o relativo excesso de “primers” promove a formação de “primers dimmers”, que podem competir com o “template” e resultar em amplificação fraca ou ausente (LIBORIO et al., 2005). A fixação de tecidos com formol pode resultar em dados incoerentes na PCR, quando baixa quantidade de “template” está disponível e apresentar resultados inconsistentes (WILLIAMS et al., 1999) e tem sido relatado a dificuldade da análise de mRNA e DNA extraídos de tecidos fixados e parafinados (JEWELL et al., 2002; STEG et al., 2006).

Outro fator que pode ter influenciado a sensibilidade da PCR em amostras fixadas em formol neste estudo, é o tamanho do produto da reação; utilizou-se protocolo para obtenção de fragmentos de cerca de 500pb. Relatos sobre a dificuldade na obtenção de longos fragmentos de DNA em tecidos fixados em formol e parafinizados tem sido descritos (BONIN et al., 2003; LIBORIO et al., 2005; QUACH; GOODMAN; SHIBATA, 2004) e produtos

relativamente curtos tem sido obtido com sucesso em vários estudos na identificação de diversos agentes patogênicos como, por exemplo, *M. tuberculosis* (178 pb) e *M. avium* (257pb) em suínos (GÓMEZ-LAGUNA et al., 2010), *M. tuberculosis* (123pb) relatado por Barcelos; Franco e Leão (2008) e papilomavírus humano (150pb) em estudo realizado por Bahare et al. (2008). Muller et al. (2003) detectaram *Leishmania* sp. (260pb) em biópsia de pele de cães e Logar et al. (2009), no estudo da provável participação do Map na doença de Crohn, conseguiram amplificar fragmentos de 298pb da sequência IS900. No entanto, fragmentos de até 600 pb também foram obtidos (HUIJSMANS et al., 2010). Portanto, para elevar a sensibilidade da PCR destas amostras é conveniente utilizar protocolos e “primers” que amplifiquem segmentos curtos de DNA e RNA (DEANDRES et al., 2005; JAMSHIDI; HAMPSON, 2007; LI et al., 2008), como foi relatado por Ferrer et al. (2007), em que a fixação prolongada não produziu DNA viável para amplificação em cérebros fixados em formalina, emblocados em parafina e arquivados por diferentes períodos de tempo. Resultados semelhantes foram observados em enfermidades causadas por príons (FERRER et al., 2007). Em relação ao tempo de armazenameto de amostras parafinadas, Liborio et al. (2005), demonstraram que é possível utilizar DNA genômico extraído de tecidos incluídos em parafina e arquivados por 40 anos, para amplificação de pequenos fragmentos através da técnica de PCR.

Portanto, a partir da correlação dos dados obtidos neste estudo, notou-se que diversos fatores podem ter interferido na ausência de reações em amostras fixadas em formol, como o tipo de amostra, tamanho do produto a ser amplificado, número de cópias do gene existente no genoma a ser detectado pelo teste, concentração do DNA alvo nas amostras, concentração do DNA não-alvo (que pode agir como inibidores) e outros inibidores remanescentes no extrato de DNA (GILBERT et al., 2007; GREER; LUND; MANOS, 1991). É importante salientar que a escolha do protocolo adequado e confiável para o diagnóstico definitivo de uma enfermidade, se deve, em parte, à comparação de resultados dos testes realizados em vários laboratórios, preferentemente de diferentes regiões, o que permite avaliar a variabilidade dos parâmetros que normalmente compõe a metodologia da PCR.

6 CONCLUSÕES

A análise histopatológica e imuno-histoquímica de secções de jejuno, íleo e linfonodos mesentéricos, permitiu detectar bovinos assintomáticos oriundos de rebanhos infectados com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, o que possibilitou o diagnóstico pré-clínico da paratuberculose em animais de abate. O exame imuno-histopatológico “post-mortem” pode disponibilizar meios adicionais para o diagnóstico precoce da enfermidade;

A técnica de Ziehl-Neelsen em cortes histológicos de bovinos assintomáticos mostrou-se ineficiente no diagnóstico pós-mortem da paratuberculose;

A solução fixadora composta por zinco demonstrou notável manutenção da histomorfologia e preservação das características histoquímicas, imuno-histoquímicas para *Mycobacterium* spp, com qualidade similar a fixação por formaldeído. A PCR de fragmentos fixados em zinco revelou manutenção da integridade do DNA tecidual e do agente etiológico da paratuberculose, ao contrário dos dados obtidos pela fixação por formol. Os resultados demonstraram que a solução de zinco pode ser uma ferramenta importante para manutenção da integridade de ácidos nucleicos o que contribui para o enriquecimento dos meios de diagnóstico molecular.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAHAMSEN, H. N. et al. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. **Journal of Molecular Diagnostic**, v. 5, n. 1, p. 34-41, 2003.

ACYPRESTE, C. S. et al. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 55-59, 2005.

ALDOUS, W. K. et al. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2471–2473, 2005.

ALINOVI, C. A. et al. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 177–179, 2009.

ALTWEGG, M. General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 23, n. 1, p. 21-30, 1995.

AMARO, A. et al. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **Letters of Applied Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 8–11, 2008.

APPLE, S. et al. The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 135, n. 4, p. 592-598, 2011.

ARNOLD, M. M. et al. Effects of fixation in tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 71, n. 5, p. 224-230, 1996.

AUSTSCHBACH, F. et al. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 944-949, 2005.

AYELE, W. Y. et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1210-1214, 2005.

BANNANTINE, J. P. et al. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1303-1310, 2002.

BANNANTINE, J. P. et al. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. **BMC Microbiology**, v. 3, p. 1-10, 2003.

BARBOSA J. D. et al. Paratuberculosis in water buffaloes (*Buballus bubalis*) in Maranhão State, Brazil. World Buiatrics Congress. Santiago, Chile, 2010.

BARCELOS, D.; FRANCO, M. F.; LEÃO, C. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 6, p. 321-326, 2008.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas : Revisão e apontamentos sobre as possíveis aplicações. NewsLab., edição 63, p. 96-114, 2004.

BARROS, C. S. L. et al. Doença granulomatosa 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.

BATTIFORA, H.; KOPINSKI, M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins: a comparison of formalin and ethanol fixation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1095-1100, 1986.

BECKSTEAD, J. H. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1127-1134, 1994.

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.

BENAVIDES, J. et al. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. **Journal of Virological Methods**, v. 137, n. 2, p. 317-324, 2006.

BENDIXEN, P. H.; BLOCH, B.; JORGENSEN, J. B. Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: light microscopic and eletron microscopic observations. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 109-113, 1981.

BENDIXEN, P.H. Immunologic reactions caused by infections with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. **Nordisk Veterinær Medicin**, v. 30, n. 4-5, p. 163–168, 1978.

BEN-EZRA, J. et al. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 351-354, 1991.

BENNETT, R.; MCCLEMENT, I.; MCFARLANE, I. An economic decision support tool for simulating paratuberculosis control strategies in a UK suckler beef herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 4, p. 286–293, 2010.

BHIDE, et al. IS900 PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 33-41, 2006.

BÖLSKE, G.; HERTHNEK, D. Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: BERHS, M. A.; COLLINS, D. M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International. 2010. Cap. 23.

BONIN, S. et al. PCR analysis in archival postmortem tissues. **Molecular Pathology**, v. 56, n. 3, p. 184-186, 2003.

BRACARENSE, A. P. F. et al. Enterite hemorrágica em bovinos leiteiros na região de Londrina, PR, alimentados com polpa cítrica. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999, p. 127.

BREES, D. J. et al. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue section. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 60-63, 2000.

BUERGELT, C. D. et al. In vitro lymphocyte transformation as a herd survey methods for bovine paratuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 4, p. 501-595, 1978.

BUERGELT, C. D. et al. Nested polymerase chain reaction an prenatal detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) in bovine allantoic fluid and fetuses. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 3, p. 232-238, 2006.

BUERGELT, C. D.; GINN, P. E. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 325-331, 2000.

BUERGELT, C. D.; WILLIAMS, J. E. Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine *paratuberculosis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 8, p. 497–503, 2004.

CARRIGAN, M. J.; SEAMAN, J. T. The pathology of Johne's disease in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 2, p. 47-50, 1990.

CARTER, B. S.; FLETCHER, J. S.; THOMPSON, R. C. Analysis of messenger RNA expression by *in situ* hybridization using RNA probes synthesized via *in vitro* transcription. **Methods**, v. 52, p. 322-331, 2010.

CARVALHO, I. A. et al. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1331-1334, 2012.

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.

CASTRO, M. G. et al. Isolamento de *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de fezes de bovinos suspeitos de paratuberculose. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFMG, 11., 2002, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2002. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/prpq/xisic/sic2002/resumos/1w2w44.html>>. Acesso em 21 nov. 2012.

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

CHIODINI, R. J. et al. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. **Digestive Disease and Sciences**, v. 29, p.1073-1079, 1984.

CHIODINI, R. J.; VAN KRUININGEN, H. J.; MERKAL, R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinary**, v. 74, p. 218-262, 1984.

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

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, n. 2, 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, n. 5, p. 261-262, 2011.

COCITO, C. et al. Paratuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.3, p.328-345, 1994.

COETSIER, C. et al. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin fixed paraffin-embedded tissues from cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, 2000.

COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious disease in livestock**. 2.ed. Sourthen Africa: Oxford University Press, 2004. 2352p.

COLLINS, M. T. et al. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4373-81, 2000.

COLLINS, M. T. Paratuberculosis: Review of present knowledge. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 217–221, 2003.

CORPA, J. M. et al. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 255-265, 2000.

COSTA, J. C. M. et al. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1491-1494, 2010.

COUSINS, D. V. et al. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS9000 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. **Molecular and cellular Probes**, 14, p.431-442, 1999.

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.

COUSSENS, P.M. et al. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1409-1422, 2004.

COX, M. L. et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 80, p. 183-191, 2006.

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

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

DABBS, D. J. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2010.

DACORSO-FILHO, P. et al . Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 3, p. 129-139, 1960.

DALTO, A. C., et al. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical. Animal Health and Production**, v. 44, p. 1-5, 2012.

DALZIEL, T. K. Chronic interstitial enteritis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1068-1079, 1913.

DANIEL, D.S., et al. The reduced bactericidal function of complement C5-deficient murine macrophages is associated with defects in the synthesis and delivery of reactive oxygen radicals to mycobacterial phagosomes. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 4688–4698, 2006.

DELGADO, F. et al. Comparison between two in situ methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3-4, p.383-387, 2009.

DOUARRE, P. E. et al. 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. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 1999.

DRIEMEIER, D. et al. Estudo Histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígado e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1998.

DUPONT, O. Jornal do Comércio do Rio de Janeiro de 05/11/1915, 1915.

EELES, R. A.; WARREN, W.; STAMPS, A. The PCR revolution. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 1, p. 289-293, 1992.

ELTOUM, I. et al. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. **Journal of Histotechnology**, v. 24, p. 277-281, 2001.

ENGLUND, S.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology**, v. 209, n. 2, p. 267-271, 2002.

FERREIRA, R. et al. Paratuberculose bovina em fazenda de produção leiteira em Resende, Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s. n.], 2003. CD-ROM.

FERREIRA, R., FONSECA, L. S., LILENBAUM, W. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 19-24, 2001.

FERRER, I. et al. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. **Brain Pathology**, v. 17, n. 3, p. 297-303, 2007.

FONSECA, L. F. L. et al. Identificação de anticorpos anti- *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 51-56, 2000.

GARCÍA-MARÍN, J. F. et al. Pathological findings in lambs experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium* subsp. *paratuberculosis*. In: CHIODINI, R. J.; COLLINS, M. T.; BASSEY, E. O. E. (Eds.). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 4. 1994. Rhode Island. **Proceedings...** Rhode Island: Evergreen Press, 1994, p. 208.

GAVA, A. et al. Polpa cítrica como causa de mortalidade em bovinos no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999, p. 76.

GILBERT, M. T. P. et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues- Which Methods Are Useful When? **Plos One**, v. 2, n. 6, e537, 2007.

GILLESPIE, J. W. et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **American Journal of Pathology**, v. 160, p. 449-457, 2002.

GILMOUR, N. J. L.; NISBET, D. I.; BROTHERSTON, J. G. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 75, p.281-286, 1965.

GJERDRUM, L. M., et al. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 1, p. 42-51, 2004.

GOELZ, S. E., et al. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded human tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 130, n. 1, p. 118-26, 1985.

GOMES, M. J. P., et al. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 2, p. 113-118, 2002.

GÓMEZ-LAGUNA, J. et al. Use of real-time and classic polymerase chain reaction assays for the diagnosis of porcine tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 123–127, 2010.

GONZALEZ L., et al. Detection of immune system cells in paraffin wax embedded ovine tissues. **Journal Comparative Pathology**, v. 125, p. 41-47, 2001.

GRANT, I. R. et al. Effect of higher pasteurization temperatures and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 461-465, 1999.

GRANT, I. R. Zoonotic potencial of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. A review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1282-1293, 2005.

GRANT, I. R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulked raw and commercially pasteurised cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2428-2435, 2002.

GREEN, et al. 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.

GREER, C. E.; LUND, J. K.; MANOS, M. M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives and prospective studies. **Genome Research**, v. 1, p. 46-50, 1991.

GWOZDZ, J. M. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 51, p. 233-44, 1997.

HAGAN, W. A. Age as factor in susceptibility to Johne's disease. **Cornell Veterinarian**, v. 28, p. 34-40, 1938.

HENDRICK, S. H. et al. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1302-1308, 2005.

HERMON-TAYLOR, J. et al. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 521-539, 2000.

HERMON-TAYLOR, J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* is a cause of Crohn disease. **Gut**, v. 49, n. 6, p. 755-756, 2001.

HERTHNEK, D. et al. Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 1095-1102, 2006.

HERTHNEK, D.; BÖLSKE, G. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 87, 2006.

HICK, D. J. et al. Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 81, n. 1, p. 23-30, 2008.

HUDA, A.; JENSEN, H. E. Comparison of histopathology cultivation of tissues and rectal contents and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 259-67, 2003.

HUIJSMANS, et al. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effects on downstream molecular applications. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 239-247, 2010.

HULTEN, K. et al. Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, n. 2, p.185-195, 2000.

HULTEN, K. et al. In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p.513-518, 2000.

HUYGEN, K.; BULL, T.; COLLINS, D. M. Development of New Paratuberculosis Vaccines. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International. 2010. cap. 30.

IKONOMOPOULOUS, J. et al. Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 315-321, 2004.

INCA. Instituto nacional de Câncer. **Formol ou Formaldeído**. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795>. Acesso em 12 nov. 2012.

ISMAIL, J. A. et al. Immunohistologic labeling of murine endothelium. **Cardiovascular Pathology**, v. 12, p. 82-90, 2003.

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.

JAMSHIDI, A.; HAMPSON, D. J. Evaluation of PCR amplification from fixed caecal tissue to determine the infection of experimentally infected laying hens with *Brachyspira pilosicoli*. **Iranian Journal of veterinary Research**, v. 8, n. 3, p. 199-204, 2001.

JENSEN, U. B. et al. Fixation preserves flow cytometry scatter and fluorescence parameters and allows simultaneous analysis of DNA content and synthesis, and intracellular and surfaces epitopes. **Cytometry A**, v. 77, n. 8, p. 198-804, 2010.

JEWELL, S. D. et al. Analysis of the molecular quality human tissues: an experience from Cooperative Human Tissue Network. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, p. 733-741, 2002.

JEYANATHAN, M. et al. Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2942-2950, 2006.

JOHANSEN, I.S. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 3, p.231-236, 2004.

JOHANSSON, M.; JANSSON, T.; POWELL, T.L. Na(+)-K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. 287-294, 2000.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J.; KANEENE, J. B. Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 67, n. 6, 1997.

JORGENSEN, J. B. An improved medium for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from faeces. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 23, p. 325-335, 1982.

JORGENSEN, J. B. The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. In:____. **Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination**. Luxembourg: European Communities Agriculture Publication, 1984. p. 131–136.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. C. **Pathologic of Domestic Animals**. 5.ed. Saunders Elsevier, 2007. 3v.

JUSTE, R. A. et al. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

infection in cattle and sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 354-359, 2005.

KHALIFEH, M. S.; STABEL, J. R. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1974–1982, 2004.

KHAN, F. A. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 633-638, 2010.

KHOL, J. L. et al. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissues and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, n. 10, p. 1283-1288, 2010.

KIM, O, J. Effect of fixation time and freeze-thaw cycles on the molecular analysis of viral DNA. **Journal of Veterinary Science**, v. 4, p. 203-204, 2003.

KLANIKOVA, B., et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 150-155, 2012.

KLOPFLEISCH, R.; WEISS, A. T.; GRUBER, A. D. Excavation of a buried treasure DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 6, p. 797-810, 2011.

KOETS, A. et al. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4+T cells, increased frequency of gamma delta cells and related changes in T cell function. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3856-3864, 2002.

KUDAHL, A. B.; NIELSEN, S. S. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4340-4346, 2009.

KUEHNEL, M. P. et al. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. **Cellular Microbiology**, v. 3, p. 551-566, 2001.

KURADE, N. P. et al. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 378-387, 2004.

LARSEN, A. B.; MERKAL, R. S.; CUTLIP, R. C. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 255-257, 1975.

LIBORIO, T. N. et al. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 405-10, 2005.

LOESCHKE, S. et al. Improved detection of mycobacterial DNA by PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using thin sections. **Pathology - Research and Practice**, v. 201, p. 37-40, 2005.

LOGAR, K. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA isolated from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of Crohn's disease patients. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 10., 2009. **Proceedings...** [S.l.], 2009. p.68-71.

LOSINGER, W. C. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 425-432, 2005.

LOWENTHAL, J. W.; CEROTTINI, J. C.; MACDONALD, H. R. Interleukin-1-dependent induction of both interleukin 2 secretion and interleukin 2 receptor expression by thymoma cells. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 4, p.1226-1231, 1986.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. Sydney: McGraw-Hill, 1968. 258p.

LYKIDIS, et al. Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 12, e 85, 2007.

MANNING, E. J. B.; COLLINS, M. T. Epidemiology of paratuberculosis. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International, 2010. cap. 3.

MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Manual Técnico**. Brasília: [s.n.], 2006. 184p.

MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphism in IS 1311. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p.115-126, 1999.

MARTINSON, S. A. et al. Comparison of bacterial culture, histopathology and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. **Journal of Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 51-57, 2008.

MASSONE, A. R. et al. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 37, n. 4, p. 251-253, 1990.

MAZOCCO, M. B. et al. Molibdenose em bovinos no estado de Santa Catarina. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2009. Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia [s.n]**, 2009. CD-ROM

MCCONNEL, C.S. et al. Surgical method for biopsy of terminal ileum and mesenteric lymph nodes of sheep for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n.3, 2004.

MCFADDEN J. J. et al. The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. **Molecular Microbiology**, v. 1, p. 283–291, 1987.

MCFADDEN, J. J. et al. Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 796–80, 1987.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. Missouri: Mosby Elsevier, 2007, 388p.

MEDEIROS, J. M. A. et al.. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 697-700, 2012b.

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

MENENDEZ, L. A. C. **Ovis: tratado de patologia y produccion ovina**. Madrid: Luzán 5, 1990. ?p.

MERKAL R.S. Diagnostic methods for the detection of paratuberculosis (Johne's disease). In: ANNUAL MEETING OF THE US ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 74., 1970. **Proceedings...** [S.n.], 1970. p. 620–623.

MOMOTANI, E. et al. 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.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 e TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunology*, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOTA, P. M. P. C. et al. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in a State of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 703-706, 2009.

MOTA, R. A. et al. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 237-242, 2010.

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

MULLER, N. et al. PCR-based detection of canine Leishmania infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 223-229, 2003.

MUSKENS, J. et al. Evaluation of the long term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 269-278, 2002.

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

NASER, S. A. et al. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. **Lancet**, v. 364, p. 1039-44, 2004.

NAVARRO, J.A. et al. Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 109-121, 1998.

NIEBERLE, K.; COHRS, P. Tuberculosis. In: _____. **Textbook of The Special Pathological Anatomy of Domestic Animals**. London: Pergamon, 1996.

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.

NRCNA. NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Diagnosis and control of the Johne's Disease**. Washington, DC: The National Academies Press, 2003.

OIE. **Paratuberculosis (Johne's disease)**. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf>. Acesso em 16 fev. 2012.

OKURA, H.; TOFT, N.; NIELSEN, S. S. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 253-263, 2012.

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

OLIVEIRA, D. M. et al. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2010.

OLSEN, I.; SIGURDARDOTTIR, O.G.; DJONNE, B. Paratuberculosis with especial reference to cattle. A review. **Vet Q**, v. 24, p. 12-28, 2002.

OPRIESSNIG, T.; MENG, XJ, HALBUR, PG. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 591-615, 2007.

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

PATHAK, S. et al. Counting mycobacteria in infected human cells and mouse tissue: a comparison between qPCR and CFU. **Plos One**, v. 7, n. 4, e34931, 2012.

PAVARINI, S. P. et al. Achados clínico-patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 611-616, 2008.

PAYNE, J.M.; RANKIN, J.D. A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. **Research in veterinary Science**, v. 2, p. 175-179, 1961a.

PAYNE, J.M.; RANKIN, J.D. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. **Research in veterinary Science**, v. 2, p. 167-174, 1961b.

PÉREZ, V; GARCÍA-MARÍN, JF; BADIOLA, J.J. Description and classification of different types of lesion associated with natural classification of different types of lesion associated

with natural paratuberculosis infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, p. 107-122, 1996.

PINEDO, P.J. et al. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, p. 125–133, 2008.

PLANTE Y., et al. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 115-20, 1996.

PNCQ. **Programa Nacional de Controle de Qualidade**. Disponível em <http://www.pncq.org.br/participantes/atualizacao_baixo_002.asp> Acesso em 24 de fevereiro de 2013.

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

POLJAK, M.; SEME, K.; KOREN, S. The polymerase chain reaction: A critical review of its uses and limitations in diagnostic microbiology. **Period Biol**, v. 98, p. 183-90, 1996.

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

QUACH, N.; GOODMAN, M.; SHIBATA, D. In vitro artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1-5, 2004.

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

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical detection of uroplakin III, cytokeratin 7 and cytocheratin 20 in canine urothelial tumours. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 55-62, 2003.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 393–413, 2008.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RIET-CORREA, F. et al. Poluição ambiental como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 4, p. 107-114, 1983.

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

RODRIGUES, A. B. F. **Paratuberculose em bovinos: análises anátomo-clínica, bacteriológica, imunohistoquímica e pela reação em cadeia da polimerase**. 93 p. 2005. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2005.

SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C. Differing lymphokine profile of functional subsets of human CD4 and CD8 T cells clones. **Science**, v.254, p.279-282, 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 2028p.

SANDERSON, J. D. et al. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. **Gut**, v. 33, p. 890-896, 1992.

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

SCHELLENBERGER, E. et al. Combined in situ zymography, immunofluorescence, and staining of iron oxide particles in paraffin-embedded, zinc-fixed tissues sections. **Molecular Imaging**, v. 11, n. 5, p. 1-6, 2011.

SCHULZ, S. et al. Molecular diagnosis of a *Mycobacterium chelonae* infection. **Pathology – Research and Practice**, v. 197, p. 123-126, 2001.

SELBY, W. Pathogenesis and therapeutic aspects of Chron's disease. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 6., 1999, Melbourne: **Proceedings...** Melbourne: International Association for Paratuberculosis, 1999. p.515-519.

SELEVSEK, N. et al. Zinc ion-induced domain organization in metallo-beta-lactamases: A flexible “zinc arm” for rapid metal ion transfer? **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p.16419-16431, 2009.

SHERMAN, D. M. What you need to know about controlling Johne's. **Hoard's Dairyman**, v. 132, p. 816-817, 1987.

SHI, S. R. et al. Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 6, p. 89-96, 1998.

SIGURDARDOTTIR, O. G. et al. Bacterial isolation immunologic response and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 542-550, 1999.

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, 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, N. M. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovino com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 285-289, 1968.

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

SINGH, A. V. et al. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recovered from suspected and Crohn's disease patients in India. **Journal of Communicable Diseases**, v. 42, n. 2, p. 91-100, 2010.

SLANA, I. et al. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 250-257, 2008.

SMITH, H. W. Modification of Dubos's media for the cultivation of *Mycobacterium johnei*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 66, p. 375-381, 1953.

SOUZA, C. D. et al. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 975-980, 2007.

SPECHT, K. et al. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. **American Journal of Pathology**, v. 158, p. 419-429, 2001.

STABEL J.R.; BANNANTINE J.P. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4744–4750, 2005.

STABEL, J. R. Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease. In: BERHS, M.A.; COLLINS, D.M. (Eds). **Paratuberculosis. Organism, disease, control**. Cambridge: CAB International, 2010. cap. 21.

STABEL, J. R. Johne's: a hidden threat. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 283-288, 1998.

STABEL, J. R.; ACKERMANN, M. R.; GOFF, J. P. Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of Johne's disease in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.469-73, 1996.

STEG, A. et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low density array: application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 1, p. 76-83, 2006.

STEWART, D. J. et al. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. **Journal of Veterinary Microbiology**, v. 104, p. 165-178, 2004.

STROMMENGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G.F. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 196, n. 1, p. 31-37, 2001

STYLIANOPOULOU, E. et al. A rapid and highly sensitive method of non radioactive colorimetric in situ hybridization for detection of mRNA on tissue sections. **Plos One**, v. 7, n. 3, e33898, 2012.

SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. 7. ed. United Kingdom: Churchill Livingstone, 2013. 654p.

SWEENEY, R. W. Transmission of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 12, n. 12, p. 305-312, 1996.

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

TANAKA, S. et al. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 579-588, 2005.

TAYLOR, A. W. Experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 63, p. 368-373, 1953b.

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

THOEN, C. O.; HAAGSMA, J. Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 4, p. 734-737, 1996.

THOREL, M. F., KRICHEVSKY, M.; LEVY-FREBAULT, V. V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 254-260, 1990.

THOREL, M.F. Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent mycobacteria. *In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination.* In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 3. Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Association for Paratuberculosis, 1991. p. 222-235.

THORENSEN, O. F.; FALK, K., EVENSEN, O. Comparison of immunohistochemistry, acid fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 195-199, 1994.

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

TIWARI, A. et al. Johne's disease in Canada. Part I: clinical symptoms pathophysiology, diagnosis and prevalence in dairy herds. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 874-882, 2006.

TOKARNIA, C. M. H. et al. **Deficiências Minerais em Animais de Produção.** Rio de Janeiro: Helianthus, 2010. 191p.

TRIPATHI, B. N.; STEVENSON, K. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin embedded tissues of goats by IS900 PCR. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PARATUBERCULOSIS, 8. **Proceedings...** [s.n], 2005. p. 525-532.

TWORT, F. A method for isolating and growing the lepra bacillus of man (preliminary note). **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 83, p. 156-158, 1910.

TWORT, F.; INGRAM, G. L. Y. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritidis of bovines. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 84, p. 517-543, 1912.

VALHEIM, M. et al. Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, p. 221-232, 2004.

VANSNICK, E. et al. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3-4, p. 197-204, 2004.

VERNA, A. E. et al. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 243-252, 2007.

WEBSTER, J. D. et al. 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.

WEISS, D. J. et al. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 721-726, 2005.

WEISS, D. J. et al. Gene expression and microbial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 326-337, 2004.

WERNER, M. et al. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 7, p. 1016-19, 2000.

WESTER, K. et al. Zinc-Based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 6, p. 889-899, 2003.

WHAN, L. B. et al. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. **Letter in Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 227-231, 2001.

WHITTINGTON, R. J. et al. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1077-83, 1999.

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.

WHITTLOCK, R. H.; BUERGELT, C. D. Preclinical and clinical manifestation of paratuberculosis (including pathology). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.12, p.345-356, 1996.

WILLIAMS, C. et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. **American Journal of Pathology**, v. 155, p. 1467-1471, 1999.

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 237-241, 2006.

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

ZHAO, H. et al. Cell Fixation in Zinc Salt Solution is Compatible with DNA Damage Response Detection by Phospho-Specific Antibodies. **Cytometry**, v. 79, n. 6, p. 470-476, 2011.

ANEXO 1. Modelo da ficha com os dados e alterações histopatológicas de cada bovino

Histopatologia de vacas com PARATUBERCULOSE						DATA:	
Identific Vaca		Registro SAP					
Camadas do intestino	Alterações	Duodeno	Jejuno	Íleo	Válvula íleo cecal	Ceco	Cólon
Mucosa	Macrófagos						
	Células gigantes						
	Linfócitos						
	Plasmócitos						
	Eosinófilos						
	Vilosidades						
	Linfáticos dilatados						
	Congestao						
	Necrose						
	Ziehl Nielsen						
	OBS						
		duodeno	jejuno	íleo	válvula íleo cecal	ceco	cólon
Muscular da mucosa	Ziehl Nielsen						
	OBS						

Continuação Anexo 1

Camadas do intestino	Alterações	Duodeno	Jejuno	Íleo	Vávula íleo cecal	Ceco	Cólon
Submucosa	Macrófagos						
	Células gigantes						
	Linfócitos						
	Plasmócitos						
	Eosinófilos						
	Prolif. Fibroblástica						
	Linfáticos dilatados						
	Congestao						
	Necrose						
	Ziehl Nielsen						
OBS							
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Vávula íleo cecal	Ceco	Cólon
Camada muscular	Ziehl Nielsen						
	OBS						
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Vávula íleo cecal	Ceco	Cólon
Serosa	Ziehl Nielsen						
	OBS						
SAP							
Linfonodo mesentérico							

Anexo 2. Solução PBS (“Phosphate Buffer Saline”) utilizado neste estudo

pH 7,2-7,4

Fosfato de sódio bibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,14g
Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4)	0,24g
NaCL	8,5g
Água destilada	1000ml