

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE- UFCG
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL- CSTR
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA- UAMV

MONOGRAFIA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM AVIUM*
SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO
ESTADO DA PARAÍBA**

Taynara Sombra de Oliveira

PATOS - PB
DEZEMBRO - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE- UFCG
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL- CSTR
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA- UAMV

MONOGRAFIA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM AVIUM*
SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO
ESTADO DA PARAÍBA**

Taynara Sombra de Oliveira

Graduanda

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Orientador

PATOS - PB
DEZEMBRO - 2016

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

- O48d Oliveira, Taynara Sombra de
Diagnóstico sorológico e molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros no Estado da Paraíba. – Patos, 2016.
31f.: il. color.
- Monografia (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.
- "Orientação: Prof. Dr. Sergio Santos de Azevedo"
- Referências.
1. Paratuberculose.
 2. *Mycobacterium avium* subsp.
 3. *Paratuberculosis*.
 4. ELISA.
 5. PCR. I. Título.

CDU 614.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA

Taynara Sombra de Oliveira
Graduanda

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para a obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo Orientador	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino Examinador I	_____ Nota
_____ Mestre Carla Lauise Rodrigues Menezes Pimenta Examinadora II	_____ Nota

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA

Taynara Sombra de Oliveira
Graduanda

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para a obtenção do grau em Medicina Veterinária.

Aprovada em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr. Sérgio Santos de Azevedo
Orientador

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino
Examinador I

Mestre Carla Lauise Rodrigues Menezes Pimenta
Examinadora II

Dedico
Primeiramente à Deus,
Aos Meus Pais e Minha irmã.
“ Tudo é considerado impossível, até acontecer” Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

A Deus, o mestre, pai e amigo mais fiel, que sempre esteve do meu lado, me dando forças e me guiando, permitindo que tudo isso acontecesse.

Aos meus pais, Ossian Paiva e Silvana Maria, que sempre apoiaram as minhas decisões e acreditaram nos meus sonhos e potencial.

A todos da minha família, pela confiança e incentivo. Especialmente a minha irmã, Dandara Ingrid, por todo apoio, dedicação, carinho e amor que sempre teve comigo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Sérgio Santos de Azevedo, pela paciência, confiança, orientação e oportunidade de aprimorar os conhecimentos que foram importantes para minha formação profissional.

A professora Dr^a Maria Aparecida, sua orientada de mestrado Carol e doutoranda Sanely, Professor Dr. Rinaldo, seu orientado de mestrado Pedro Paulo pela confiança, atenção, contribuição e ajuda na realização dos testes, que foram fundamentais para os resultados da minha monografia.

Aos professores da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, em especial ao Professor Gildenor Xavier, por toda a amizade e pelos conhecimentos que me passaram e por ajudarem na minha formação profissional.

Aos meus amigos, Emílio, Peterson, Davi, Sandy, Agrício, Talisson que fizeram parte da minha formação, muito obrigada pelo apoio diário, paciência, companheirismo, amizade e pelo carinho de vocês.

A minhas amigas, em especial a Iraci Ribeiro, por todo carinho, apoio, amizade e confiança.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação profissional, apoiando e incentivando e que mesmo não sendo citados não foram esquecidos e fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica, muito obrigado a todos.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Resultado do teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	24
Figura 2. Resultado do teste de ELISA indireto.....	26

RESUMO

OLIVEIRA, TAYNARA SOMBRA. **Diagnóstico sorológico e molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros no Estado da Paraíba.** Monografia. Patos, UFCG. 2016.

A paratuberculose, também conhecida como doença de Jonhe, é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, causada por um bacilo álcool ácido resistente, denominado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que provoca uma enterite e linfadenite granulomatosa e apresenta distribuição mundial, com a capacidade de afetar várias espécies, como ovinos, caprinos, ruminantes selvagens, equinos, suínos, lebres, raposas, roedores e principalmente os bovinos. A enfermidade apresenta importância para economia, pois causa redução da eficiência alimentar, diminuição da produção de leite, redução do peso de abate, baixa eficiência reprodutiva e aumento dos custos sanitários; e para a saúde pública, devido ao possível caráter zoonótico da doença. No Brasil, já foram relatados casos de paratuberculose em bovinos em alguns Estados das regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Este trabalho propôs realizar um estudo sorológico e molecular, através dos teste de ELISA e PCR, para determinar a presença do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em propriedades rurais com animais soropositivos no Estado da Paraíba. Foram avaliadas 45 amostras de sangue e leite de bovinos, provenientes de propriedades em Quixaba, Santa Luzia e João Pessoa. Observou-se resultado negativo na realização do teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e resultado positivo em oito amostras através do ELISA. Os resultados sugerem que a paratuberculose pode estar ocorrendo na forma subclínica nos rebanhos leiteiros estudados, indicando a necessidade de ampliar os estudos de isolamento e identificação do agente na região.

Palavras- chave: Paratuberculose, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, ELISA, PCR.

ABSTRACT

OLIVEIRA, TAYNARA SOMBRA. **Diagnóstico sorológico e molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros no Estado da Paraíba.** Monografia. Patos, UFCG. 2016.

Paratuberculosis, also known as Jonhe's disease, is a chronic infectious-contagious disease caused by a bacillus acid-fast acid called *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP), which causes enteritis and granulomatous lymphadenitis and is distributed worldwide, with the capacity to affect several species, such as sheep, goats, wild ruminants, horses, swine, hares, foxes, rodents and especially cattle. The disease is important for economics because it causes reduced food efficiency, reduced milk production, reduced slaughter weight, low reproductive efficiency and increased sanitary costs; And public health, due to the possible zoonotic character of the disease. In Brazil, cases of paratuberculosis have been reported in cattle in some states of the South, Southeast and Northeast regions. This work aimed to carry out a serological and molecular study, through ELISA and PCR, to determine the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) on rural properties with seropositive animals in the State of Paraíba. We evaluated 45 blood samples and milk from cattle from Quixaba, Santa Luzia and João Pessoa. A negative result was observed in the Polymerase Chain Reaction (PCR) test and a positive result in eight samples by ELISA. The results suggest that paratuberculosis may be occurring in the subclinical form in the dairy herds studied, indicating the need to expand the studies of isolation and identification of the agent in the region.

Key-words: Paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, ELISA, PC

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Etiologia e patogenia.....	11
2.2 Epidemiologia.....	12
2.3 Sinais Clínicos	14
2.4 Patologia.....	15
2.4.1 Alterações macróscopicas.....	15
2.4.2 Alterações microscópicas	15
2.5 Diagnóstico.....	16
2.5.1 Diagnóstico clínico.....	16
2.5.2 Diagnóstico laboratorial	16
2.6 Controle e profilaxia	18
2.7 Importância para economia e saúde pública	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Coleta das amostras.....	20
3.3 Diagnóstico laboratorial	21
3.3.1 Diagnóstico sorológico	21
3.3.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A paratuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que apresenta distribuição mundial e afeta principalmente bovinos, porém já tem sido diagnosticada em ovinos, caprinos, ruminantes silvestres, equinos, suínos, coelhos e raposas.

A doença faz parte da lista de enfermidades da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), portanto, é considerada uma doença transmissível e de importância sócioeconômica e para a saúde, cujo impacto sobre o comércio internacional de animais e de produtos de origem animal é relevante, visto que os prejuízos dessa enfermidade podem trazer consequências para a economia.

Embora haja opiniões divergentes no que diz respeito ao caráter zoonótico da infecção, há relatos de isolamento de MAP em seres humanos acometidos por doença de Crohn. Some-se a isso o fato de que o agente é altamente resistente a pasteurização do leite, e a sua ingestão pode ser uma via de transmissão. Dessa maneira, deve-se existir uma preocupação com a doença de Crohn, tendo em vista que os sinais clínicos e achados patológicos em humanos são bem parecidos com aqueles que ocorrem em animais.

Existem vários métodos de diagnóstico para a infecção por MAP, no entanto, alguns testes não apresentam sensibilidade e especificidade adequadas de acordo com fase da infecção, o que ainda é um desafio para o controle da enfermidade. No geral, deve ser realizada uma associação dos sinais clínicos apresentados pelo animal com a aplicação de testes de diagnóstico para eliminar a probabilidade de ocorrência de falsos positivos.

Em 2014 foi realizado um projeto, cujo tema era “Caracterização epidemiológica e espacial da paratuberculose bovina e bubalina no Estado da Paraíba”, em que foram utilizados 2504 animais de 480 propriedades rurais e realizado o teste de ELISA indireto em todas as amostras, cujo resultado foi 252 animais positivos de 53 propriedades. A partir dos dados obtidos neste estudo, verificou-se, através de diagnóstico sorológico, que a infecção por MAP está ocorrendo no Estado da Paraíba. No presente trabalho foram utilizadas propriedades rurais que apresentaram animais soropositivos neste estudo prévio, com posterior aplicação de diagnóstico molecular e sorológico em amostras de leite e sangue.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e patogenia

A Paratuberculose, também conhecida como doença de Jonhe, é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool ácido resistente, se caracteriza por ser uma bactéria gram positiva, aeróbia e possuir dependência em micobactina, que provoca uma enterite e linfadenite granulomatosa (COELHO; QUINTAS, 2012; WHITLOCK, 2006; HARRIS; BARLETTA, 2001).

O período de incubação varia de 8-12 semanas e após a infecção o agente etiológico possui a capacidade de replicação dentro dos macrófagos, da lâmina própria do intestino delgado, intestino grosso e nos linfonodos mesentéricos, onde ficam protegidos e não conseguem ser destruídos pela resposta imune do hospedeiro. É importante salientar que o agente não produz toxinas e não causa danos celulares, e sua virulência está associada à capacidade de resistência à destruição pelos macrófagos através da inibição da conversão de fagossomo em fagolisossomos. Dessa forma, o agente consegue sobreviver ao processo de destruição intracelular ocasionado pelas células de defesa do intestino (YAMASAKI, 2010; RIET- CORREA; DRIEMEIER, 2007; LILENBAUM et al., 2007). Além disso, a doença apresenta uma longa fase subclínica, ocasionando dificuldades para o controle e grandes perdas na produção (BENNET et al., 2012).

O MAP provoca uma reação inflamatória granulomatosa na mucosa intestinal, que promove uma junção das vilosidades intestinais, e desencadeia uma síndrome da má absorção. A parede intestinal espessada começa, gradativamente, a perder proteínas do sangue para o intestino, resultando em uma perda direta de nutrientes da corrente sanguínea, causando uma hipoproteinemia. Além disso, provoca queda de produção e da fertilidade, e aumento da susceptibilidade à infecções secundárias (GOMES, 2013; YAMASAKI, 2010).

Durante o curso da infecção, ocorrem períodos de remissão e exacerbação da atividade imunológica, demonstrando que a doença é o reflexo da reação imune do hospedeiro. Na fase terminal, macrófagos infectados conseguem chegar a corrente circulatória, provocando bacteremia e disseminação do microrganismo para o fígado, rins, pulmões, trato reprodutor e úbere (YAMASAKI, 2013; STABEL, 2010).

O MAP possui uma alta resistência à pasteurização e aos fatores químicos e físicos, permitindo sobreviver por vários meses no solo, na água e nas fezes. Algumas pesquisas comprovaram a resistência do agente à dessecação, a condições ácidas e desinfetantes (CHIODINI et al., 1984).

2.2 Epidemiologia

A doença tem distribuição mundial, e possui a capacidade de afetar várias espécies, tais como ovinos, caprinos, ruminantes selvagens, equinos, suínos, lebres, raposas, roedores e principalmente os bovinos. Além disso, existem evidências e pesquisas que sugerem o possível envolvimento da doença de Jonhe com a doença de Crohn (DC) que causa uma inflamação crônica e granulomatosa no intestino de humanos (CARVALHO, 2014; CHIODINI et al., 2012; GILARDONI; PAOLICCHI; MUNDO; 2012; CIRONE, 2006).

Segundo um estudo realizado por Carvalho (2014), o DNA do MAP foi detectado em alguns pacientes com Doença de Crohn. Sendo este, o primeiro relato da presença do agente em biópsias intestinais de pacientes com suspeitas de DC. A transmissão para os seres humanos também pode acontecer através do consumo de água ou alimentos contaminados (GASPAR-GRILLO et al., 2012).

A infecção ocorre principalmente nos primeiros seis meses de idade devido à imaturidade do sistema imunológico dos neonatos. Os animais jovens são mais susceptíveis à infecção orofecal do que os adultos. A manifestação dos sinais clínicos pode acontecer geralmente entre os dois e cinco anos de idade (GILARDONI; PAOLICCHI; MUNDO; 2012).

De acordo com Nielsen e Toft (2008) alguns hospedeiros podem ser portadores subclínicos ou assintomáticos, devido à característica de apresentar infecção latente, sendo esta a principal forma de introdução da enfermidade em rebanhos livres. A transmissão ocorre principalmente pela via oro-fecal, através do consumo de pastagens contaminadas com fezes de animais infectados ou quando neonatos entram em contato com o úbere contaminado com fezes que contêm o MAP, no momento da ingestão do colostro ou leite, ou pela via intra-uterina, mesmo quando a mãe é clinicamente sadia (LOMBARD, 2011; RIET- CORREA; DRIEMEIER, 2007).

Segundo Luenda et al (2013) e Chiodini (1984) existem alguns fatores de risco, que podem favorecer a transmissão da doença, como presença de animais jovens no rebanho, propriedades com criação intensiva, solos ácidos, deficiência alimentar, estresse, transporte de animais, períodos de gestação, lactação, parição e imunossupressão, devido à alguns agentes infecciosos. A doença é mais comum nas regiões temperadas e climas úmidos, existindo indícios de que os bovinos mantidos em solos alcalinos estão menos suscetíveis a adquirir a doença (GOMES, 2013). As criações leiteiras são as mais afetadas e apresentam uma maior prevalência da doença em relação aos animais de corte, pois o confinamento e o maior contato com as fezes, propicia condições para a propagação da infecção entre os indivíduos. A prevalência da doença aumenta em propriedades com animais que apresentam sinais clínicos e continuam o convívio com os outros animais, principalmente se tiver a presença de neonatos que são os mais susceptíveis à infecção, ou quando são mantidos em situações precárias, com manejo nutricional deficiente (NIELSEN; TOFT, 2008).

Nos estágios mais avançados da doença, as vacas que estão infectadas liberam as micobactérias diariamente nas fezes. Devido ao longo período de incubação da doença, a disseminação do agente pelas fezes dos animais infectados pode ocorrer por mais de 18 meses, sem que os sinais clínicos da doença apareçam. São eliminadas em média 5×10^5 microrganismo/dia/animal com a forma clínica da doença, representando uma ameaça para os bezerros e para os outros animais. O MAP pode permanecer em diversos ambientes por anos (BARKEMA et al., 2012, LOMBARD, 2011, CHIODINI et al., 1984).

A imunidade específica contra micobactérias é essencialmente mediada por células; os anticorpos possuem eficácia limitada contra estes agentes e a sua destruição está principalmente relacionada a mecanismos intracelulares de eliminação através de macrófagos infectados (STABEL, 2010).

Existe uma certa dificuldade para a detecção dos animais infectados no rebanho, devido ao lento desenvolvimento da doença, persistência do agente dentro de macrófagos, e a discreta e prolongada transição entre os três estágios da infecção, que consiste em fase subclínica, fase subclínica excretora e fase clínica excretora. Na fase subclínica, o processo infeccioso se desenvolve sem que ocorra a eliminação do agente. Na fase subclínica excretora, a concentração de micobactérias na mucosa e lúmen intestinal aumentam gradativamente, sem o aparecimento de sinais clínicos. Na fase clínica excretora, ocorre uma diarreia crônica e aparecimento de sintomas infecciosos generalizados (BEHR; COLLINS 2010; COCITO et al., 1994).

Os animais podem ser classificados de acordo com a relação entre agente e hospedeiro, definindo-se em animais infectados resistentes, intermediários e clínicos. Os infectados resistentes são geralmente animais adultos que conseguem desenvolver resistência rapidamente, controlando a infecção e não sendo eliminadores do agente. Os animais intermediários não conseguem controlar completamente a infecção, alguns tornam-se os eliminadores do agente. Os animais clínicos geralmente são os animais jovens que apresentam a síndrome da má absorção, devido à característica do agente de penetrar na mucosa intestinal e causar uma diminuição na absorção das proteínas (BLOOD et al., 1991).

No Brasil há relatos da Paratuberculose em bovinos em alguns estados das regiões Sul, Sudeste e Nordeste (MOTA et al, 2009; RIET- CORREA; DRIEMEIER, 2007). No Estado da Paraíba, Mota et al. (2009) relataram o primeiro diagnóstico da doença em bovinos e Oliveira et al. (2010), relataram em ovinos e caprinos. De acordo com Vilar (2015) e Medeiros (2011), a frequência de animais soropositivos para o MAP no Estado da Paraíba é alta, ressaltando a importância da realização de mais estudos para verificar os impactos da doença na região.

2.3 Sinais Clínicos

As micobactérias causam uma intensa reação inflamatória granulomatosa na mucosa intestinal, promovendo um colapso das vilosidades intestinais e conseqüentemente provocam uma diminuição na absorção dos nutrientes, conhecido como síndrome da má absorção (RIET- CORREA; DRIEMEIER, 2007; WHITLOCK, 2006).

O principal sinal observado na fase clínica é a diarreia crônica e persistente, não responsiva ao tratamento. Associado a esse quadro clínico, pode ocorrer desidratação, caquexia, fraqueza generalizada, perda progressiva de peso, febre intermitente, pelos sem brilho e com falhas. Os sinais geralmente aparecem pela primeira vez em animais mais jovens, no entanto a doença pode acometer animais em qualquer idade ao longo de 1 a 2 anos e no gado leiteiro é mais comum observá-la entre 3 e 5 anos. O curso clínico da doença pode variar de três a seis meses, podendo antes disso, no estágio terminal, ocorrer perda total do apetite, edema ventral, caquexia, debilitação e morte (CRUZ, 2015; OIE, 2014; GOMES, 2013; TEIXEIRA, 2008).

Ainda não são bem conhecidos os fatores que estão associados à mudança do estágio assintomático para o estágio sintomático. Em fêmeas gestantes, alguns fatores podem influenciar o aumento de incidência da doença logo após o parto, como estresse e a alta

produção leiteira, no entanto os resultados de infecções experimentais não confirmam este ponto de vista. Há indícios de que a concentração de ferro e vitamina D da dieta poderia modular o curso da doença, mas os estudos experimentais são contraditórios (GOMES, 2013).

2.4 Patologia

2.4.1 Alterações macroscópicas

Em bovinos com Paratuberculose, os achados de necropsia mais característicos estão presentes na fase avançada da doença, quando os sinais clínicos já estão evidentes. As lesões macroscópicas caracterizam-se por enterite proliferativa localizada, a parede intestinal apresenta-se mais espessada, com aspecto cerebroide e anelado devido à formação de rugas e pregas na mucosa, podendo ser observado edema, hemorragias petequiais e úlceras focais. Os linfonodos mesentéricos encontram-se reativos e edemaciados, e ao corte flui uma grande quantidade de líquido leitoso. Nas grandes artérias, principalmente na base da aorta, observa-se placas com aspecto embranquiçado e opaco, que consistem de mineralização. Além disso, a linfangite é um achado específico e importante para auxiliar no diagnóstico (BRITO; MOTA; YAMASAKI, 2014; RIET- CORREA; DRIEMEIER, 2007).

2.4.2 Alterações microscópicas

Nas lesões histopatológicas é possível observar infiltração da mucosa e lâmina própria do intestino com presença de macrófagos, linfócitos, células gigantes, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos. Lesões granulomatosas ocorrem nos linfonodos e vasos linfáticos, com proliferação de fibroblastos e fibras colágenas (OIE, 2014; DRIEMEIER, 1999).

Segundo Yamasaki (2013) e Rodrigues (2005), os principais achados histopatológicos foram encontrados no intestino delgado, em que foi possível observar enterite, linfangite, linfangiectasia e linfadenite granulomatosa, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório de linfócitos, eosinófilos e principalmente macrófagos que apresentam aspecto de células gigantes de Langhans. Essas lesões se restringiam às túnicas mucosa e submucosa, especialmente no jejuno, íleo e nas válvulas ileocecais. Em casos clínicos avançados, foi possível detectar lesão granulomatosa multifocal com presença de bacilo álcool-ácido resistente e algumas vezes difusa nos linfonodos mesentéricos.

A observação de bacilos álcool-ácido resistentes no intestino delgado associado com as alterações macroscópicas típicas da doença permitem assegurar o diagnóstico anatomopatológico (MOTA et al., 2007).

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico da doença na fase clínica em bovinos pode ser realizado através da anamnese e dos sinais clínicos apresentados pelo animal, principalmente se tiver a presença de diarreia crônica, emagrecimento progressivo e desidratação. Além disso, é necessário a realização de necropsia e de exames laboratoriais para a confirmação do diagnóstico (OIE, 2014).

2.5.2 Diagnóstico laboratorial

A sorologia, imunologia, cultivo bacteriano, histopatologia e a biologia molecular são alguns métodos de diagnóstico laboratorial. No entanto, o diagnóstico laboratorial pode ser dificultado devido ao lento crescimento do MAP e pela sua resposta imune complexa. Para evitar resultados falso positivos, é importante considerar o quadro clínico do animal e realizar uma associação de três ou mais métodos de diagnóstico, podendo ser utilizado o teste de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), fixação de complemento (FC), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), cultivo bacteriológico, reação em cadeia de polimerase (PCR) e a imunohistoquímica (IHQ). Alguns testes, como ELISA e cultura bacteriológica, não conseguem identificar os bacilos no início da infecção (BRITO; MOTA; YAMASAKI, 2014; CARVALHO, et al 2012, YAMASAKI, 2010, MARASSI, 2005).

Os testes sorológicos mais utilizados para detecção de anticorpos são fixação de complemento, imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ELISA, sendo considerados os mais sensíveis no diagnóstico da enfermidade subclínica. O teste de fixação de complemento é menos específico e o de imunodifusão é menos sensível. Já o de ELISA pode detectar aproximadamente 60% dos animais que excretam o agente através das fezes, e possui especificidade de 99% (OIE, 2014; YAMASAKI et al., 2013; ACYPRESTE et al., 2005).

Outro exame que pode ser utilizado é o bacterioscópico, que consiste em uma técnica rápida, feito com coloração de esfregaços de amostras pelo Ziehl-Neelsen. O cultivo de amostras fecais é o método padrão ouro, todavia apresenta algumas desvantagens, como o custo elevado, hipercrescimento de culturas com contaminantes, presença de germes ácido resistentes saprófitos nas fezes e a demora no diagnóstico, podendo durar até 16 semanas para finalizar o resultado (GOMES, 2013; CARVALHO et al., 2013; CARVALHO, 2008; SILVA, 2005).

De acordo com Ristow et al (2006) o protocolo de avaliação de cultivo fecal através da centrifugação recomendada pela OIE demonstraram os melhores resultados quanto à recuperação de MAP. Segundo Pradenas et al (2008) a cultura com amostras fecais associado com o teste de ELISA indireto pode ser utilizado com êxito para a detecção da infecção em rebanhos leiteiros. Constataram a importância de combinar o diagnóstico molecular (PCR) com cultura bacteriológica para identificação positiva de vacas em um rebanho.

Covarrubias et al (2012), mostrou mais uma alternativa para o diagnóstico, através do resultado obtido pelo teste de ELISA com o antígeno protoplasmático derivado de uma cepa de MAP 3065 de origem ovina, obtendo a sensibilidade de 79,31% e especificidade de 82,25%. Associado a isso, recomendou a realização de teste sorológico e PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada, e se baseia na detecção e amplificação dos segmentos específicos do DNA da bactéria, através de amostras de fezes, tecidos e leite. O alvo mais frequentemente usados são o gene que codifica o 16S rRNA, e o elemento de inserção IS900 (LILENBAUM et al., 2007). A PCR apresenta vantagens em relação a identificação convencional por meio do exame bacteriológico, sendo um teste específico, rápido e de sensibilidade elevada nos casos clínicos. Todavia, a sua sensibilidade, depende da eficiência da extração do DNA a partir de amostras clínicas, das condições de amplificação e do método de detecção dos produtos da PCR. Além disso, apresenta outra desvantagem de ser caro, laborioso e que exige técnicos especializados (BRITO; MOTA; YAMASAKI, 2014; CARVALHO, 2008).

De acordo com Gilardoni (2012), a sensibilidade e especificidade dos testes realizados, variam de acordo com o estágio da doença nos animais. Diante disso, a escolha e aplicação correta de cada um dos testes auxilia e garante o sucesso do diagnóstico, permitindo o estabelecimento de programas de controle.

2.6 Controle e profilaxia

Segundo Lilenbaum et al (2007) não existe um tratamento eficaz para animais doentes e os programas de controle são baseados em medidas de manejo e abate de animais sintomáticos.

É fundamental evitar a transmissão da enfermidade para animais mais jovens, utilizando medidas como rotina de higiene das instalações após cada ordenha, separação de bezerros de animais adultos, isolamento dos animais que estão apresentando os sintomas, realização de testes para identificação de animais infectados, evitar alimentação dos bezerros com colostro provenientes de vacas infectadas, proibição da importação de animais originários de países que não possuam um programa de controle para a doença e a realização de campanhas para conscientizar os proprietários (BARKEMA et al., 2012).

2.7 Importância para economia e saúde pública

As principais perdas econômicas decorrentes da presença do agente nos rebanhos são: redução da eficiência alimentar, diminuição da produção de leite, redução do peso de abate, baixa eficiência reprodutiva, aumento na incidência de mastite, conversão alimentar pobre e maior predisposição a outras doenças (FREITAS, 2014; BRITO; MOTA; YAMASAKI, 2014; HASONOVA; PAVLIK, 2006).

A importância da paratuberculose para a Saúde Pública deve-se ao possível potencial zoonótico da doença (OIE, 2015). De acordo com Retamal et al (2011) e Naser et al (2009), existem diversas evidências que sugerem que o MAP possui capacidade de infectar os humanos. Porém, ainda não foi possível comprovar se o mesmo é o agente etiológico da doença ou consequência de uma infecção secundária. Diante disso, o potencial zoonótico da bactéria deve ser investigado devido as semelhanças entre os processos clínicos, fisiopatológicos e histopatológicos da doença de John e da doença de Crohn. O leite e as fezes são as principais vias de eliminação do agente, contaminando os pastos e, direta ou indiretamente, as fontes de água podendo infectar humanos pela ingestão de água contendo o microrganismo viável. Sendo confirmado por pesquisas que demonstraram a presença do agente em amostras de leite cru (GIESE e AHRENA, 2000) e em leite comercializado, demonstrando que consegue resistir à pasteurização High-Temperature Short-Time (HTST), sendo esta não totalmente eficaz na eliminação do MAP.

Segundo Braga (2015), foi possível comprovar a presença do MAP na água para consumo humano e animal na região da Zona da Mata Mineira, em que o agente foi identificado em 50% das amostras de água para consumo animal e em 30% das amostras de água para consumo humano. Diante disso, as pesquisas realizadas evidenciaram que o leite e a água representa um veículo de transmissão do agente para humanos, sendo fundamental alertar tanto os produtores como a população sobre a importância dessa enfermidade, visto que é uma doença que pode trazer vários prejuízos econômicos e possíveis prejuízos para a saúde pública.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foi realizado um estudo epidemiológico para a infecção por MAP no Estado da Paraíba (Vilar et al., 2015), no qual foram utilizados 2504 animais de 480 propriedades rurais das regiões de Sertão, Borborema e Agreste, em que foi possível constatar através de teste sorológicos, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), 53 propriedades positivas e 252 animais positivos, com prevalência de 11,8% e 10,7%, respectivamente. No presente trabalho foram selecionadas três propriedades que apresentaram as maiores prevalências de animais soropositivos, com a colheita de sangue e leite de todas as vacas em lactação.

3.2 Coleta das amostras

Foram selecionadas propriedades em Quixabá, Santa Luzia e Joao Pessoa, no estado da Paraíba. Em cada propriedade rural selecionada foram realizadas três coletas pareadas de sangue e leite de todas as vacas em lactação, em intervalos de 15 dias. Não sendo possível realizar a terceira coleta na propriedade de Santa Luzia, devido à venda dos animais. As amostras de sangue foram coletadas em volumes de 10 mL com tubos a vácuo sem anti-coagulante e com capacidade de 15 mL. As amostras de leite foram coletadas em tubos tipo Falcon, em volumes de 15 ml, sendo os três primeiros jatos de leite descartados. A identificação dos tubos utilizou um código de 4 dígitos, dos quais os dois dígitos iniciais significaram o código da propriedade e os dois dígitos finais a seqüência do número da fêmea amostrada. O transporte das amostras para o Laboratório de Doenças Transmissíveis da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) foi realizado em caixas térmicas com suporte plástico para os tubos de sangue e de leite, gelo reciclável com embalagem rígida, nos tamanhos 400 ml (médio) e 550 ml (grande). No laboratório as amostras de sangue foram centrifugadas e os soros transferidos para microtubos, e em seguida as amostras foram acondicionadas em forma de duplicata e congeladas para a realização dos testes sorológicos. O leite foi separado em estantes e congelado para a posterior realização do teste molecular.

3.3 Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico da doença, foram realizados dois testes laboratoriais. Para o diagnóstico sorológico, foram utilizadas as amostras de soro e realizado o teste ELISA indireto. Para o diagnóstico molecular, foram utilizadas as amostras de leite e realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

3.3.1 Diagnóstico sorológico

O teste de ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Doenças Transmissíveis da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), utilizando-se kits comerciais da IDEXX Paratuberculosis Screening e seguindo as recomendações do fabricante. A primeira etapa realizada foi o preparo e distribuição das amostras em um placa de diluição não impregnada com o antígeno, após isso foi feito a diluição do controle positivo, controle negativo e das amostras com o tampão de diluição. Posteriormente, foi seguido o protocolo do teste, com a realização de transferência das amostras para placas apropriadas e impregnadas com o antígeno, incubação das amostras por 45 minutos, lavagem da placa, distribuição do conjugado, incubação do conjugado por 30 minutos, lavagem da placa, distribuição do substrato, incubação do substrato por 10 minutos e distribuição da solução de interrupção. Em seguida, foi realizado a leitura e interpretação dos resultados, através de cálculos protocolados pelo fabricante.

3.3.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV)-MG e na Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE). Para a realização da técnica, primeiramente foi realizada a extração do DNA, para posterior realização da PCR. Dessa maneira, para a extração do DNA, foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), utilizado conforme as instruções do fabricante. Foi aplicado protocolo utilizando lisozima 2% e outro utilizando proteinase K, ambos contendo os passos de lise, precipitação proteica, precipitação do DNA e reidratação do DNA. Posteriormente foi mensurado a concentração de DNA, utilizando NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific), a média da concentração de extração de DNA das

amostras de leite foi 21,5 ng. A seguir, foi realizado a PCR com o primer IS900 para detecção de MAP. O controle positivo foi DNA de MAP K10 e o negativo água ultrapura. Para a realização da técnica de PCR foi utilizado o kit Go Taq® Green Master Mix de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação teve um volume final de 25 µl, sendo 12,5 µl de mix, 6,5 µl de água nuclease, 1µl de primer F e primer R e 4µl do DNA extraído da amostra de leite. As amostras foram colocadas no termociclador e submetida a três ciclos: desnaturação a 95°C para separação das fitas de DNA, anelamento a 57° C para a fita se unir aos primers e extensão a 72°C, para amplificação da sequência de DNA. Posteriormente, o resultado da PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estado da Paraíba, dados de ocorrência da Paratuberculose em rebanhos de bovinos ainda são escassos, o que torna o estudo relevante para verificar a condição epidemiológica, bem como os fatores que podem contribuir para a difusão da enfermidade e os testes laboratoriais utilizados para a detecção do agente. Durante a realização das coletas, os animais não apresentaram sinais clínicos semelhantes aos da doença, como diarreia profusa e intermitente, emagrecimento progressivo, desidratação; sendo sugestivo que esses poderiam estar infectados nos estádios iniciais da enfermidade, quando já eliminam o microorganismo para o ambiente, mas ainda não apresentam sinais clínicos. Os resultados das amostras dos 17 animais e das 45 amostras de sangue e leite foram realizados através das análises sorológicas e moleculares (tabela 1). A análise sorológica realizada pelo teste de ELISA indireto revelou que 8 amostras foram consideradas positivas e 3 suspeitas (figura 2).

Os testes sorológicos são constantemente utilizados para a detecção de animais com infecção subclínica, dentre os quais se destaca o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), uma vez que é mais sensível do que a fixação de complemento e a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sendo capaz de detectar anticorpos em baixas concentrações (LILENBAUM et al., 2007).

Segundo Lombard (2011) afirma que uma quantidade das moléculas de IgG presentes no leite seja derivado do transporte de IgG do soro, sendo a maior parte delas produzidas por células da glândula mamária. A infecção inicialmente é localizada no intestino e a presença de grandes quantidades de IgG no leite não é esperado nos estádios iniciais da doença, em que não ocorre a presença dos sinais clínicos. Diante disso, Carvalho 2008, pode concluir que o resultado dos testes de ELISA utilizando amostras de soro e leite, apresentaram resultados diferentes.

Alguns animais, quando expostos ao Map, desenvolvem uma resposta imune protetora que destrói o microrganismo e torna o animal positivo no teste sorológico. Com repetidas exposições ao antígeno, tais animais resistentes e não infectados permanecem reagentes ao teste. No entanto, há dificuldades em se diferenciar animais resistentes de infectados, através de testes imunológicos, pois estes informam o status de exposição e não de infecção. Diante disso, a presença de animais reagentes não necessariamente significa que o rebanho está infectado, pode ser sugestivo de que o animal já teve contato com o agente (CHIODINI et al., 1984).

De acordo com Acypreste et al (2005) e Covarrubiasa et al (2012) o ELISA serviu com alternativa no diagnóstico, sendo um dos testes sorológicos indicativo da presença de anticorpos anti-*M. Paratuberculosis*.

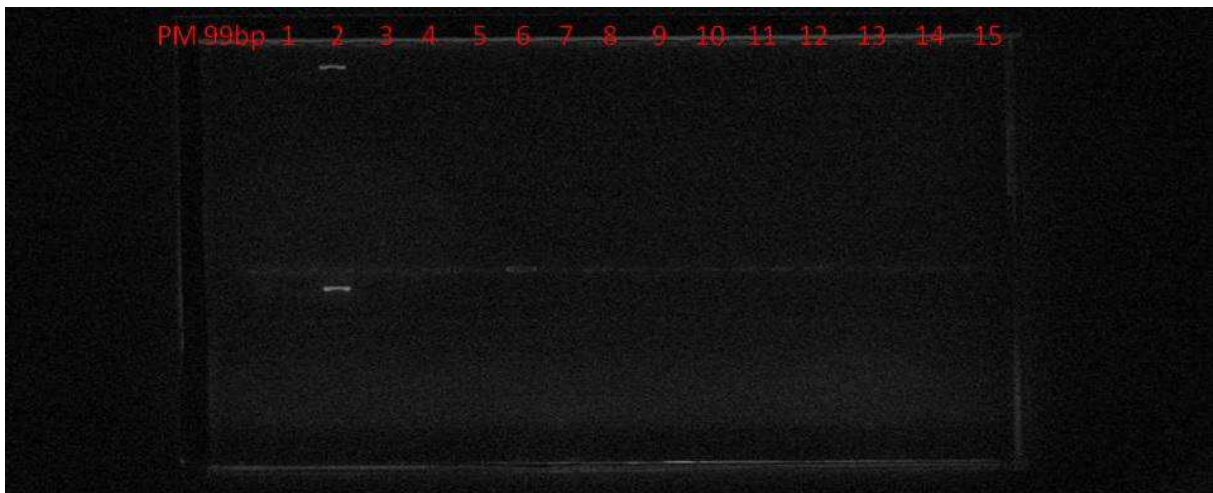
Das 45 amostras coletadas, não foram detectados o agente, após o processamento das amostras de leite avaliadas pelo teste da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)- figura 1. Diante dos resultados encontrados na PCR, as moléculas de DNA ao ser evidenciado por meio de eletroforese em gel de agarose podem não ter sido observadas provavelmente em função da grande quantidade de gordura presente nas amostras (CARVALHO, 2008).

De acordo com Brito; Mota; Yamasaki (2015) e Cocito et al, (1994), mesmo que o PCR apresente boa sensibilidade e especificidade para a detecção do agente, ainda não é sensível o suficiente para detecção de antígenos especialmente em casos contendo poucos bacilos álcool ácido resistentes (BAARs). Diante disso, o resultado pode ter sido negativo, considerando que o agente apresenta a característica de eliminação intermitente e o número de bactérias eliminadas no leite poderia ser pequeno quando as amostras foram coletadas.

A sensibilidade do teste para identificar o agente em amostras clínicas, como leite e tecidos é semelhante ou um pouco menor que a cultura. Uma das possíveis razões para esta baixa sensibilidade pode ser a presença de substâncias inibidoras de DNA e a dificuldade para a sua remoção.

Segundo Carvalho (2008), existem poucos estudos publicados que utilizam a técnica de PCR para a detecção do Map em amostras de leite individual *in natura*, sendo necessário mais estudos que utilizem esse teste para comparar resultados e determinar sua eficiência.

Figura 1: Resultado do teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).



Descrição das amostras: 1= controle negativo ; 2 = controle positivo; 3-15: amostras de DNA

Tabela 1. Resultados das análises sorológicas e moleculares.

Identificação dos animais	Identificação das propriedades	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
		PCR/ ELISA	PCR/ELISA	PCR/ELISA
0101	A	-/-	-/-	-/-
0201	B	-/-	-/-	NR
0202	B	-/-	-/-	NR
0203	B	-/+	-/+	NR
0204	B	-/-	-/-	NR
0205	B	-/-	-/-	NR
0206	B	-/-	-/-	NR
0301	C	-/+	-/-	-/-
0302	C	-/-	-/-	-/+
0303	C	-/-	-/+	-/-
0304	C	-/-	-/-	-/-
0305	C	-/-	-/-	-/-
0306	C	-/-	-/-	-/-
0307	C	-/-	-/-	-/-
0308	C	-/-	-/-	-/-
0309	C	-/+	-/+	-/-
0310	C	-/+	-/-	-/+

Legenda: **A**- Quixaba; **B**- Santa Luzia; **C**- João Pessoa; **NR**- não realizado; (-) negativo; (+) positivo; total de animais: 17; total de amostras: 45

Figura 2. Resultado do teste de ELISA indireto.

	01	02	03	04	05	06
A	SMP01 0.263	SMP02 0.418	SMP03 0.262	SMP04 0.282	SMP05 0.265	SMP06 0.362
B	SMP13 0.262	SMP14 0.284	SMP15 0.309	SMP16 0.277	SMP17 0.259	SMP18 0.359
C	SMP25 0.243	SMP26 0.256	SMP27 0.240	SMP28 0.245	SMP29 0.267	SMP30 0.224
D	SMP37 0.280	SMP38 0.475	SMP39 0.261	SMP40 0.247	SMP41 0.301	SMP42 0.309
E	SMP49 0.235	SMP50 0.234	SMP51 0.333	SMP52 0.410	SMP53 0.267	SMP54 0.225
F	SMP61 0.425	SMP62 0.209	SMP63 0.211	SMP64 0.276	SMP65 0.275	SMP66 0.204
G	SMP73 0.334	SMP74 0.432	SMP75 0.270	SMP76 0.441	SMP77 0.272	SMP78 0.296
H	SMP85 0.280	SMP86 0.015	SMP87 0.234	SMP88 0.217	SMP89 0.346	SMP90 0.454

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode se observar que a Paratuberculose bovina está ocorrendo na forma subclínica nos rebanhos leiteiros estudados, indicando a necessidade de ampliar os conhecimentos com a realização de estudos de isolamento e identificação do agente na região, para estimar a extensão do problema, com vistas à implantação de medidas de prevenção para evitar a disseminação desta enfermidade.

REFERÊNCIAS

- ACYPRESTE, C. S. et al. Uso da Técnica do Elisa Indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium Paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 55-59, jan./mar. 2005.
- BARKEMA, H. W. et al. **An Update on the Alberta Johne's Disease Initiative**. *Advances in Dairy Technology*, v. 24, p. 319-331. 2012. Disponível em: <<http://www.wcds.ca/proc/2012/Manuscripts/Barkema.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2015.
- BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. **Paratuberculosis: Organism, disease, control**. 2010. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=iS8P8x2-O68C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 20 ago. 2015.
- BENNETT, R.; McCLEMENTE, I.; McFARLANE, I. Modelling of Johne's disease control options in beef cattle: A decision support approach. **Live Stock Science**, n. 146, p. 149–159. 2012.
- BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M., GAY, C.C. **Doenças Causadas por Bactérias**. Clínica Veterinária, p. 597 -622. (In: artigo rodrigues). 1991.
- BRAGA, I. F. E. ***Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (map): identificação água e fatores de risco para a presença em amostras de biópsias intestinais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. 2015.
- BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; YAMASAKI, E. M. **Paratuberculose: perguntas e respostas**. Recife: EDUFURPE, 2014. Disponível em: <<http://institucional.ufrj.br/sap/files/2014/12/cartilha-PARATUBERCULOSE-Perguntas-e-Respostas-out-2014.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2015.
- CARVALHO, I. A. et al. Diagnosis of paratuberculosis in cattle: microbiological culture, serology and PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 581-585, 2012.
- CARVALHO, I. A. **Isolamento e detecção molecular de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) em rebanhos bovinos leiteiros na região de Viçosa-MG**. Viçosa: UFV, 2008, 55f. Dissertação (Magister Scientiae)- Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/4968/texto%20completo.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 24 ago. 2015.
- CARVALHO, I. A. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Brazilian patients with inflammatory bowel diseases and in controls. **Sao Paulo Med J**. 134(1), p.13-19. 2014.
- CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN, H.J. MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Vet.**, 74: 218 -262. 1984.
- CHIODINI, R. J. et al. Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association?. **Critical Reviews in Microbiology, Informa Healthcare**. ed. 38(1), p. 52–93.2012.
- CIRONE, K. M. et al. Viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en la maduración de quesos caprinos y bovinos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**. v. 40 n. 4, p. 507-13, 2006.
- COCITO, C et al. Paratuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n.3, jul, p. 328-345. 1994.

- COELHO, A. C.; QUINTAS, H. Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes. **Instituto Politécnico de Bragança**. Bragança: 2012. p. 135-142. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/7264/3/Guia%20Sanita%CC%81rio%20para%20Criadores%20de%20Pequenos%20Ruminantes.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2015.
- COLLINS, M. T; MANNING, E. J. B. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revista Science Technology International Epizooties**, v. 20, n. 1, p. 133-150. 2001.
- COVARRUBIAS, A. G. et al. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. **Revista Mexicana Ciências Pecuarias**, p.1-18. 2012.
- CRUZ, C. L. **Paratuberculose: associação dos dados clínicos com os dados de rejeição de carcaças de bovino no matadouro por caquexia**. Universidade de Évora, Departamento de Medicina Veterinária, 2015.
- DRIEMEIER, D. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 109-115, jul/dez. 1999.
- FREITAS, T. D. **Paratuberculose em ruminantes na região do semiárido paraibano- Brasil**. Patos: UFCG, 2014, 85f. (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, Patos. 2014. Disponível em: <http://www.cstr.ufcg.edu.br/ppgm/dissertacoes/teses/tese_2014/theonys_freitas.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2015.
- GASPAR-GRILLO, J. A. et al. **Isolamento e identificação de micobactérias em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento de Araraquara-sp**. Alim. Nutr., Araraquara, v. 23, n. 1, p. 147-155, jan./mar. 2012.
- GIESE, S. B; AHRENS, P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. **Veterinary Microbiology**, v. 77, 2000.
- GILARDONI, L. R.; PAOLICCHI, F. A.; MUNDO, S. L. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, p. 201-215, 2012.
- GOMES, M. JP. **Gênero *Mycobacterium* spp**. FAVET- UFRGS, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Mycobacterium%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2015.
- HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology reviews/ Department of Veterinary and Biomedical Sciences**. Nebraska: University of Nebraska, v. 14, n. 3, p. 489-512, jul. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88986/>>. Acesso em: 23 out. 2015.
- HASONOVA, L; PAVLIK, I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 5, p. 193–211, 2006.
- LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D; OELEMANN W, M .R. Paratuberculosis: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 2007, p. 580-590.
- LOMBARD, J. E. Epidemiology and economics of Paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, p. 525–535, 2011.

- LUENDA et al. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p.310-313, mar, 2013.
- MARASSI, C. D. et al. Improvement of an in-house elisa for bovine paratuberculosis serology in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 118-122, 2005.
- MEDEIROS, J. M. A. **Paratuberculose em Ruminantes no Semiárido Paraibano**. Patos: UFCG, 2011. 38 p. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.
- MOTA, P. C. et al. Paratuberculose em um rebanho Gir leiteiro no Estado da Paraíba Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 703-706, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000900004>. Acesso em: 28 ago. 2015.
- MOTA, R. A. et al. **Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no estado de Pernambuco, PE**. Arq. Inst. Biol. São Paulo, v. 74, n. 2, p. 73-79, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_2/mota.pdf >. Acesso em: 17 ago. 2015.
- NASER, S. A. et al. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) from the Blood of Patients with Crohn's disease: A Follow-Up Blind Multi Center Investigation. **The Open Inflammation Journal**, v. 2, p. 22-23. 2009. Disponível em: <http://www.johnes.org/handouts/files/Naser_3-lab_blind_study_2009.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- NIELSEN, S.; TOFT, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon g assay ad fecal culture techniques. **Veterinary Microbiology**. Copenhagen, n. 129, p. 217-235, 2008. Disponível em: <ftp://s173-183-20152.ab.hsia.telus.net/AgroMediaDocs/JDrefs/VM129_217.pdf >. Acesso em: 27 jul. 2015.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.67-72, janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010000100011&script=sci_arttext >. Acesso em: 17 ago. 2015.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). **Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2015**. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/> >. Acesso em: 09 maio. 2015.
- PRADENAS, M.; KRUIZE, J.; SCHAİK, G. Sensibilidad del cultivo de pool fecal para detectar infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en rebaños bovinos de leche y su relación con la prueba de ELISA. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 40, p. 31-37, 2008.
- RETAMAL, M. P. et al. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. **Revista Médica de Chile**, v. 139, p. 794-801. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872011000600015&script=sci_arttext >. Acesso em: 17 ago. 2015.
- RIET-CORREA, F.; DRIEMEIER, D. Paratuberculose. In: RIET- CORREA . et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. v.1, p. 407- 411.
- RISTOW, P. et al. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture protocols and media1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 1-4, jan./mar. 2006.

RODRIGUES, A. B. F. **Paratuberculose em bovinos: análises anatomoclínica, bacteriológica, imunoistoquímica e pela reação em cadeia da polimerase**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2005, 105f. Dissertação (doutorado). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGANIMAL_3897_1164634353.pdf>. Acesso em: 10 out. 2015.

SILVA, E. B. S. **Diagnóstico da paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciências Animal, 2005.

STABEL, J. R. Immunology of Paratuberculosis. Infection and Disease. **In: Berhs M.A. & Collins D.M.** (Eds), Paratuberculosis: Organism, disease, control. CABI.org, Cambridge. 375p. 2010.

SWEENEY, R.W. Transmission of paratuberculosis. In: Sweeney R.W. (ed.) Paratuberculosis (Johne's disease). Vet. Clin. North Am, 1996, p. 305-312.

TEIXEIRA, P. E SIMÕES, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e Veterinária, p. 597 -622. (In: artigo rodrigues). 1991.

VILAR, A. L.T. et al. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, p. 49-55. 2015.

WHITLOCK, R. Doença de Jonhe (Paratuberculose). In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de grandes animais**. 3. Ed. Tradução: Adriana de Souza Coutinho et al. São Paulo: Manole, 2006. Cap. 30, p. 779-782.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf>. Acesso em: 09 maio. 2015.

YAMASAKI, E. M. **Aspectos clínico- patológicos da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro no município de Rio Claro, RJ**. Rio Claro: UFRRJ, 2010, 80f. (Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia/ Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/posgrad/cpmv/teses/yamasaki.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

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

YAMASAKI, E. M. et al. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.127-140, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000200001>. Acesso em: 17 ago. 2015.